

УДК 581.085

Н.А. Вечернина, О.К. Таварткиладзе,
И.Д. Бородулина, А.А. Эрст

Адаптация растений-регенерантов с использованием гидропоники

Ключевые слова: регенеранты, культуральный фенотип, адаптация к условиям *ex vitro*, размножение *in vitro*, ризогенез, гидропоника.

Адаптация растений-регенерантов к условиям выращивания *ex vitro* является заключительным этапом микроразмножения растений. До сих пор неудачи на этом этапе у многих видов растений существенно снижают эффективность их размножения *in vitro*. Поэтому необходимо совершенствовать приемы адаптации регенерантов, применение которых было бы одинаково успешно как для единичных ценных экземпляров растений, так и при их крупномасштабном тиражировании.

Трудности на этом этапе напрямую связаны с целым рядом анатомических и физиологических особенностей растений-регенерантов, которые они приобретают в условиях роста *in vitro*, формируя специфический культуральный фенотип, связанный прежде всего с особенностями листьев регенерантов. При культивировании на искусственной питательной среде растениям обеспечивается миксотрофное питание, причем гетеротрофное – за счет сахарозы, а автотрофное – благодаря процессу фотосинтеза. Однако сосуды для соблюдения стерильности закрывают пробками (из фольги), а имеющийся в наличии углекислый газ быстро исчерпывается, поэтому происходит ингибирование автотрофного роста. Условия дефицита углекислого газа вызывают соответствующее приспособление ассимиляционной ткани листьев, изменение функциональной активности фотосинтетического аппарата и состояния замыкающих клеток устьиц. Кроме того, близкая к насыщающей влажность воздуха, отсутствие градиента водного потенциала между испаряющей поверхностью листа и атмосферой приводят к ингибированию транспирации, являющейся движущей силой верхнего концевой двигателя, а следовательно, и системы дальнего транспорта. Последнее вызывает снижение водоудерживающей способности листьев регенерантов за счет отсутствия функционирования устьиц, плохо развитой кутикулы и сниженного осмотического потенциала. Таким образом, привыкание к специфическому комплексу факторов культуры *in vitro* вызывает адекватные приспособительные реакции растений. Но в естественных условиях, после пересадки регенерантов *ex vitro*, такие приспособления оказываются нецелесообразными, так как происходит необратимое обезвоживание растений-регенерантов [1, с. 413].

Культуральный фенотип определяется также особенностями корневой системы регенерантов. Ведь для роста и развития регенерантов необходимы минеральные вещества, за поступление которых ответственна корневая система. Поэтому происхождение и структура формирующихся на микрочеренках корней играет важную роль в адаптации регенерантов. В тех случаях, когда после обработки ауксинами у микрочеренков появляется каллус и формируются толстые корни, то, как правило, между корнями и побегами осуществляется плохая сосудистая связь. В формирующихся боковых корнях также отмечаются изменения в проводящей системе и гипертрофия кортикального слоя. Нормально образующиеся корни те, которые регенерируют без образования каллуса [2, с. 225]. Следует также отметить, что формирующаяся в условиях *in vitro* корневая система регенерантов часто характеризуется отсутствием корневых волосков, а также корней второго порядка. По этой причине регенеранты имеют небольшую площадь питания и слабую поглотительную способность, что также отрицательно сказывается *ex vitro* на этапе их адаптации к новым условиям роста.

Перечисленные выше особенности регенерантов являются общими и характерными для всех растений, полученных путем регенерации *in vitro* и культивируемых в этих условиях. Поэтому на последнем этапе микроразмножения для растений-регенерантов необходимо создание таких условий, при которых они будут способны перейти с миксотрофного типа питания на автотрофное и, следовательно, смогут продолжить свой рост и развитие в новых для них условиях – *ex vitro*.

Цель исследования – оптимизировать минеральный состав питательного раствора для адаптации регенерантов разных видов растений на гидропонике.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования являлись регенеранты земляники садовой (сорт Сельва), примулы пругоницкой и смородины золотистой (сорт Ида).

Все регенеранты были получены на агаризованных питательных средах для укоренения, содержащих различные концентрации ауксина 3-индолилмасляной кислоты (ИМК): 1 мкМ (примула пругоницкая), 2 мкМ (земляника садовая), 4 мкМ (смородина золотистая). Регенеранты вынимали из культуральных сосудов, отмывали корни в дистиллированной воде от агара, растения закрепляли в кассетах и помещали в вегета-

ционную кювету гидропонной установки «Минивит 0,35», заполненную питательным раствором (30 л).

Период адаптации регенерантов на гидропонной установке составил для земляники садовой и примулы пругоницкой 20 суток, для смородины золотистой – 40 суток.

Результаты исследований и их обсуждение.

Большинство растений адаптируют в теплицах, где нет проблем с созданием для растений повышенной влажности; понизить влажность возможно, но она всегда в теплице будет выше, чем в условиях открытого грунта. Поэтому растения из теплиц вынуждены проходить еще одну адаптацию: к условиям открытого грунта, где также происходит их гибель. При адаптации в теплице существует опасность, связанная с тем, что в условиях повышенной влажности возможно загнивание растений, и даже такие приемы, как опрыскивание листьев и смачивание почвенного субстрата фунгицидами, не гарантируют выживание всех регенерантов.

Альтернативный подход к адаптации регенерантов связан с использованием гидропонных установок «Минивит», разработанных для выращивания зеленых овощных культур. В этих установках вместо субстрата используется жидкая среда, а семена или, как в нашем случае, растения-регенеранты фиксируются в кассетах с вкладышами. Установки компактны, снабжены системой освещения, просты в эксплуатации и работают в автоматическом режиме. Самая небольшая по полезной площади установка «Минивит 0,35» (0,35 м²) позволяет одновременно адаптировать до 1000 растений-регенерантов, причем даже разных видов.

Мы не использовали составы широко применяемых стандартных питательных смесей для гидропо-

ники. Это объясняется тем, что в них не все элементы питания присутствуют в виде свободных ионов, некоторые из них образуют комплексы и осадки. Как отмечают некоторые исследователи, Fe⁺⁺ выпадает в осадок в виде Fe(PO₄)·2H₂O (штрэнгит), а Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ и микроэлементы Cu⁺⁺, Mn⁺⁺, Zn⁺⁺ в присутствии хелатов образуют с ними хелатные комплексы [3, с. 2120].

Для того чтобы избежать указанных выше проблем, во время адаптации к новым условиям выращивания (*ex vitro*) гидропонную установку заполняли раствором минеральных солей по прописи МС [4, с. 490]. Был использован полный, ½ и ¼ состав по прописи МС, а также изучено влияние модифицированных по содержанию KН₂РO₄ и NH₄NO₃ составов ¼ МС на рост и развитие регенерантов в период их адаптации.

Первые эксперименты по изучению влияния минеральной основы питательного раствора на рост и развитие растений-регенерантов были проведены с растениями земляники сорта Сельва. В таблице 1 представлены результаты, полученные в конце эксперимента.

В тех случаях, когда применялись модифицированные растворы, адаптацию проводили с использованием двух гидропонных установок, заполненных соответствующими растворами, а кассеты с растениями-регенерантами через 10 суток переставляли из одной установки в другую. Как показали полученные результаты, минеральный состав питательного раствора, использованный в гидропонных установках, оказал существенное влияние на рост и развитие регенерантов земляники. Так, питательный состав по прописи МС оказался самым неэффективным по всем показателям. Кроме того, необходимо отметить, что у регенерантов за весь период адаптации происходило лишь незначительное увеличение пло-

Таблица 1

Характеристики регенерантов земляники (сорт Сельва) (до/после адаптации), адаптированных на гидропонной установке, n= 10

№ варианта	Минеральный состав раствора	Число корней, шт.	Средняя длина корня, мм	Высота розетки, мм	Число листьев, шт.
1	МС	5,8±1/7,2±1	32±5/50±6	24±2/35±5	6±1/6±1
2	½ МС	6,1±2/8,5±2	35±4/58±5	24±1/45±6	5±1/7±1
3	¼ МС	6,0±2/10,1±3	40±8/85±9	26±2/58±6	5,5±1/7±1
4	¼ МС + 340 мг/л KН ₂ РO ₄ (1–10-е сутки), ¼ МС + 1650 мг/л NH ₄ NO ₃ (11–20-е сутки)	6,1±2/10,5±2	41±5/104±10	27±2/85±9	6±1/7±1
5	¼ МС + 510 мг/л KН ₂ РO ₄ (1–10-е сутки), ¼ МС + 1650 мг/л NH ₄ NO ₃ (11–20-е сутки)	6,2±2/12,6±3	37±9/118±12	23±3/105±18	5,8±1/7±2
6	¼ МС + 680 мг/л KН ₂ РO ₄ (1–10-е сутки), ¼ МС + 1650 мг/л NH ₄ NO ₃ (11–20-е сутки)	5,8±1/11,5±3	40±6/89±8	25±2/95±12	5±1/7±1
7	¼ МС + 510 мг/л KН ₂ РO ₄ (1–10-е сутки), ¼ МС + 412,5 мг/л NH ₄ NO ₃ (11–20-е сутки)	5,7±1/9,2±2	36±5/95±10	27±2/86±9	6±1/7±2

щади листовых пластинок. Использование питательных растворов с пониженной концентрацией минеральных солей ($\frac{1}{2}$ и $\frac{1}{4}$ состава) способствовало лучшему развитию регенерантов, по сравнению с полным составом. Однако у всех регенерантов отмечено развитие небольшого числа корней второго порядка и незначительное увеличение размера листовой пластинки.

Полученные результаты подтвердили, что рост растений зависит от концентрации минеральных солей; как недостаток, так и чрезмерное их количество может тормозить рост растений. По методу Чеснокова, например, в гидропонной культуре лучший рост и развитие ряда растений получается при одноразовом или периодическом голодании растений, особенно по азоту [5, с. 260]. В ряде работ по изучению особенностей минерального питания растений с использованием гидропоник показано, что при недостатке фосфора у проростков уменьшается размер листьев [6, с. 880], увеличивается число боковых корней и плотность корневых волосков [7, с. 685; 8, с. 250]. С другой стороны, отмечено, что при низких концентрациях азота уменьшается биомасса как побегов, так и корней [9, с. 261], причем больше половины сухого вещества аккумулируется в корнях [10, с. 114]. То есть, изменяя концентрацию минеральных солей в питательном растворе, можно регулировать рост и развитие растений.

Нами проведены эксперименты по модификации основного состава минеральных солей по прописи МС для приготовления раствора, используемого в гидропонной установке. В одной гидропонной установке был применен раствор, включающий $\frac{1}{4}$ состава МС и более высокие концентрации фосфора (340, 510 или 680 мг/л K_2HPO_4). На этих растворах регенеранты росли на протяжении первых десяти суток адаптации. В последующие 10 суток кассеты с регенерантами переставляли на вторую установку, в которой концентрация фосфора была редуцирована и соответствовала составу $\frac{1}{4}$ МС, а концентрация азота увеличена за счет добавления 1650 мг/л NH_4NO_3 . Кроме того, был проверен состав раствора $\frac{1}{4}$ МС (табл. 1, вариант 7), на котором регенеранты росли на второй стадии адаптации, т.е. в последующие 11–20-е сутки.

Все характеристики регенерантов в конце адаптации были лучше при двустадийной адаптации, по сравнению с использованием одностадийного подхода. На питательном растворе с увеличенной концентрацией фосфора (1–10-е сутки адаптации) происходил значительный рост корней в длину, закладывались новые корни первого порядка, а на второй стадии (11–20-е сутки адаптации), когда регенеранты испытывали дефицит фосфора, образовывались корни второго порядка. У всех регенерантов при двустадийной адаптации отмечено лучшее развитие листьев, имеющих более длинные и толстые черешки, а также более крупные листовые пластинки.

Лучшие результаты получены при использовании растворов $\frac{1}{4}$ МС+510 мг/л K_2HPO_4 в первые 10 суток и $\frac{1}{4}$ МС + 1650 мг/л NH_4NO_3 в последующие 10 суток периода адаптации (табл. 1, вариант 5). Последовательное использование именно этих растворов позволило получить регенеранты, у которых к концу периода адаптации вдвое увеличилось число корней, втрое – их длина, а также в 4,5 раза возросла длина черешков листьев, а листовые пластинки у этих регенерантов имели наибольшую площадь (рис. 1).



Рис. 1. Регенеранты земляники садовой (сорт Сельва) до (слева) и после (справа) адаптации на гидропонной установке (20-е сутки)

Помимо подбора минерального состава питательного раствора, необходимо было в течение 7 суток создать повышенную влажность. Это достигалось путем укрытия регенерантов легкой полиэтиленовой пленкой, затем укрытие снимали, растения перемещали на вторую установку, где они продолжали расти в условиях 40–50% влажности.

Пригодность двустадийного подхода к адаптации и использование для этого соответствующего минерального состава раствора апробированы и на регенерантах других видов растений, в том числе примулы пругоницкой (табл. 2, рис. 2), а также был проведен предварительный эксперимент с трудно укореняемыми растениями смородины золотистой.

На гидропонную установку помещали регенеранты высотой 1–1,5 см, имеющие по 3–4 корня длиной 1,5–2 см.

Таблица 2

Характеристика развития растений-регенерантов примулы пругнищковой на гидропонной установке, n=20

Число корней у регенерантов, шт.	Прирост	
	корни, шт./см	листья, шт./см
1	8±1/47±9	4±1/2±1
3–4	15±2/102±15	9±3/2±1



Рис. 2. Регенеранты *Primula prugnicensis* до (слева) и после (справа) адаптации на гидропонной установке (20-е сутки)



Рис. 3. Регенерант смородины золотистой (сорт Ида) после адаптации на гидропонной установке (40-е сутки)

Слабо развитая в условиях *in vitro* корневая система смородины золотистой к концу периода адаптации на гидропонной установке хорошо разрослась, высота регенерантов составила к концу периода адаптации 21–23 см (рис. 3).

Таким образом, проведенные исследования показали, что усовершенствованный и разработанный двустадийный прием адаптации растений-регенерантов к условиям выращивания *ex vitro* с исполь-

зованием гидропонных установок, заполненных питательным раствором определенного состава на каждой стадии адаптации ($\frac{1}{4}$ МС+510 мг/л KH_2PO_4 в первые 10 суток и $\frac{1}{4}$ МС + 1650 мг/л NH_4NO_3 в последующие 10 суток) характеризуется высокой эффективностью, универсальностью и позволяет получить растения-регенеранты с хорошо развитой корневой системой и надземной частью у различных видов растений.

Библиографический список

1. Гиголашвили, Т.С. Условия микроклонирования формируют специфический культуральный фенотип / Т.С. Гиголашвили, О.Н. Родькин, В.Г. Реуцкий // Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда: тез. докл. VII междунар. конф. (25–28 ноября 1997 г., Москва). – М., 1997.
2. Moreira, M.F. Anatomical aspects of IBA-treated micro-cuttings of *Gamphrena macrocephala* St.-Hil / M.F. Moreira, B. Appezzato-Gloria, L.B.P. Zaidan // Braz. Arch. Biol. and Technol. – 2000. – 43, №2.
3. De Rijck, G. Comparison of the mineral composition of twelve standard nutrient solutions / G. de Rijck, E. Schrevens // J. Plant Nutr. – 1998. – 21, №10.
4. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plantar. – 1962. – 15, №2.
5. Полевой, В.В. Физиология растений / В.В. Полевой. – М., 1989.
6. Hong, L. Seed size is closely related to phosphorus use efficiency and photosynthetic phosphorus use efficiency in common bean / L. Hong, Y. Xiaolong // J. Plant Nutr. – 1999. – 22, №6.
7. Raghothama, K.G. Phosphate acquisition / K.G. Raghothama // Annu. Rev. Plant Physiol. and Plant Mol. Biol. Vol. 50. – Palo Alto (Calif.), 2000.
8. Lopez-Bucio, J. Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the Arabidopsis root / J. Lopez-Bucio, E. Hernandez-Abreu, L. Sanchez-Calderon, M.F. Nieto-Jacobo, J. Simpson, L. Herrera-Estrella // Plant Physiol. – 2002. – 129, №1.
9. Yoneda, K. Effects of macroelement concentrations on growth, flowering, and nutrient absorption in an *Odontoglossum* hybrid / K. Yoneda, N. Suzuki, I. Hasehawa // Sci. hort. (Neth.). – 1999. – 80, №3–4.
10. Dobrota, C. Relations between growth, chlorophyll content and nitrate distribution in *Zea mays* growing under nitrogen limitation / C. Dobrota // Stud. Univ. Babes-Bolyai. Biol. – 1999. – 44, №1–2.