

УДК 630\*232.414.4

М. А. Иванова, аспирант (ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»);  
В. Е. Падутов, д-р биол. наук (ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»);  
И. М. Баландина, науч. сотрудник (ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»);  
Е. Н. Химченко, техник (ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»);  
Н. В. Осипенко, техник (ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»)

### ЭФФЕКТИВНОСТЬ АДАПТАЦИИ РЕГЕНЕРАНТОВ ОСИНЫ И БЕРЕЗЫ В УСЛОВИЯХ *EX VITRO*

Одним из способов массового получения посадочного материала для нужд лесного хозяйства является метод микроклонального размножения лесных культур. При переносе регенерантов в нестерильные условия *ex vitro* растения испытывают стресс и погибают. Целью данной работы стало выявление факторов риска, влияющих на адаптацию микроклональных растений осины и березы для минимизации этого влияния. Было обнаружено, что критическим фактором является перемещение растений в условия с меньшей влажностью. Установлено, что для посадки желательнее отбирать регенеранты высотой 3–4 см, с количеством корней более двух, а первый этап адаптации при повышенной влажности должен продолжаться до трех-четырёх недель.

One of ways of mass reception of a planting material for needs forestry is the method of micro-propagation of wood cultures. At carrying over regenerantov in unsterile conditions *ex vitro* plants have stress and perish. Revealing of the risk factors influencing adaptation of mikroklonal plants of an aspen and a birch became the purpose of the given work to minimise this influence. Was discovered that the critical factor is shift of plants in conditions with smaller humidity. It has been established that for planting it is desirable to select of regenerants 3–4 sm, with quantity of roots more than two, and the first stage of adaptation at the raised humidity should proceed about three-four weeks.

**Введение.** Для закладки целевых плантаций на больших площадях требуется значительное количество посадочного материала. Одним из вариантов решения этой проблемы является массовое производство посадочного материала с использованием метода микроклонального размножения, с помощью которого можно быстро получить необходимое количество растений нового генотипа или сохранить коллекцию. Выращивание здорового посадочного материала и ускоренное размножение ценных форм лесных пород – приоритетное направление в мировом лесоводстве. Для генотипов микроклональное размножение является гораздо более эффективным по сравнению с традиционным размножением, а в некоторых случаях и единственно возможным [1, 2]. Высокое качество оздоровленного посадочного материала оправдывает повышенные затраты на технологию микроклонального размножения. Отмечено, что с размноженных *in vitro* маточных растений получают в 2 раза больше саженцев, причем их качество выше, чем у подвоев, полученных с материнских растений, размноженных традиционными способами.

В настоящее время не существует полноценной технологии микроклонального размножения, отвечающей в должной степени требованиям, предъявляемым лесоводами и питомниководами к скорости размножения и качеству получаемого посадочного материала. При переносе растений из стерильных условий выращивания (*in vitro*) в нестерильные почвенные условия (*ex vitro*) может погибать значительная часть (80–

95%) посадочного материала [3], так как растения *in vitro* представляют собой специфический морфотип растений, которые должны адаптироваться к нестерильным условиям *ex vitro* (пониженная влажность, более высокая интенсивность света, патогенная микрофлора почвы и окружающей среды), существенно отличающимся от условий культивирования в пробирке (повышенная влажность, дефицит углекислого газа). Поэтому оптимизация условий адаптации и выращивания микроклонально размноженного посадочного материала (регенерантов) является актуальной проблемой [4].

Ключевым фактором для успешной акклиматизации растений является состав субстрата. Традиционно для адаптации применяют следующие виды субстратов: перлит, торф со слоем песка сверху, торф в смеси с плодородной землей в соотношении 3 : 1, крупнозернистый песок, смесь торфа и песка 1 : 1, а также торфа и бурого угля в той же пропорции, субстраты, содержащие минеральную вату [5].

Белорусскими и зарубежными исследователями проанализированы возможности ризогенеза в условиях *ex vitro* [6], показано, что важными факторами при посадке регенерантов в условия *ex vitro* являются сроки высадки, качество субстратов, высота регенерантов, длина корня и др.

Целью данного исследования стало выявление факторов риска, влияющих на адаптацию микроклональных растений осины и березы в условиях *ex vitro* для минимизации этого влияния.

**Основная часть.** Исследования проводились в лаборатории генетики и биотехнологии Института леса НАН Беларуси. Объекты исследования – микрклональные растения осины *Populus tremula* (L.) – 3 клона Pt, V22 и 215, и один клон березы повислой, или бородавчатой *Betula pendula* (Roth.). Для получения всесторонней информации о росте и формировании растений этих клонов необходимо определение значений морфометрических показателей на различных этапах выращивания растений. Для проведения исследований было взято по 100–109 растений трех клонов осины (V22, Pt и 215).

Клон Pt: источником экспланта послужило дерево, которое отличается быстрым ростом и устойчивостью против сердцевинной гнили, место произрастания – Ленинградская область (Россия).

Клон 215: источник экспланта – дерево, которое относится к исполинской форме, отличается быстрым ростом и устойчивостью против сердцевинной гнили, место произрастания – Кировская область (Россия).

Клон V22: источником экспланта является дерево, которое относится к зеленокорой форме осины, отличается быстрым ростом и устойчивостью против сердцевинной гнили, место произрастания – Минская область (Беларусь).

Источником экспланта клона березы является дерево, которое относится к ромбовидно-трещиноватой форме. Отобран в городских посадках г. Гомеля как быстрорастущая и устойчивая форма. Клон бб31 (31) отличается очень сильным ростом в культуре и в почве.

*In vitro* размноженные растения укоренялись на стандартной среде WPM, освещение – 2,5–3 тыс. люкс, температура – 25°C.

Для адаптации в нестерильных условиях использовался следующий субстрат: смесь низинного торфа с песком в соотношении 3 : 1, неавтоклавированная. Состав водной вытяжки приготовленного субстрата представлен в табл. 1.

Адаптация регенерантов проходит в четыре условных этапа.

Первый этап адаптации – растения после ризогенеза *in vitro* высаживают в кассеты объемом 100 мл, заполненные субстратом. Кассеты устанавливают в установку с климат-контролем (поддерживаемая влажность – 80–90%). Длительность этапа – 2 недели. Условия первого

этапа адаптации: освещенность – 4–5 тыс. лк, температура – 21–23°C, фотопериод – 16/8 часов.

Второй этап адаптации – кассеты с растениями переставляют в установку с климат-контролем, где поддерживается влажность 50–60%. Длительность этапа – 1 месяц. Условия второго этапа адаптации: освещенность – 4–5 тыс. люкс, температура – 21–23°C, фотопериод – 16/8 часов.

Третий этап адаптации – растения переставляют из установки с климат-контролем в отапливаемое помещение. Условия третьего этапа адаптации: освещенность – 4–5 тыс. лк, температура – 21–23°C, фотопериод – 16/8 часов, влажность – 30%.

Четвертый этап адаптации – растения высаживаются в отдельные контейнеры объемом 0,5 л в условия закрытого грунта (теплица Корневской экспериментальной лесной базы Института леса НАН Беларуси).

Данный эксперимент мы проводили на первом и втором этапах адаптации.

Морфологическое развитие растений учитывали по показателям высоты стволика (см) от корневой шейки до последней развитой почки. Также учитывался процент сохранности регенерантов и прирост спустя 2 недели, 1 месяц и 2 месяца.

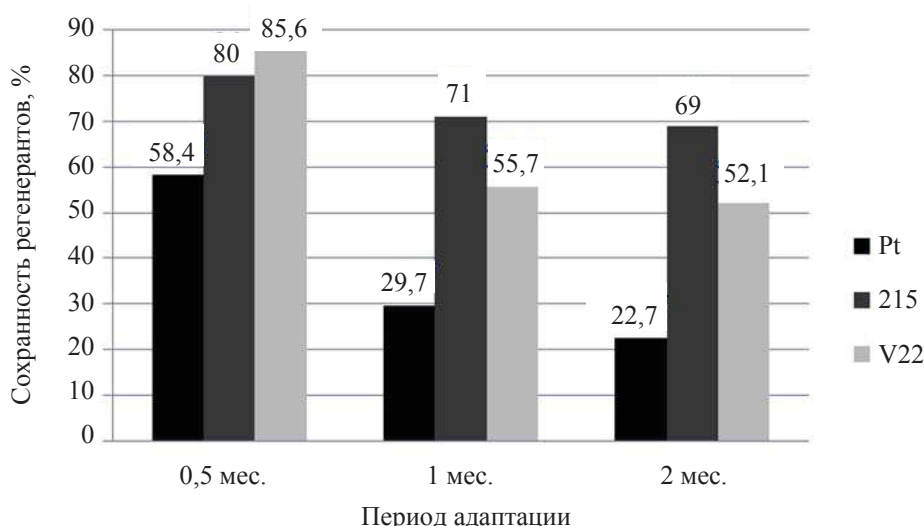
Статистическую обработку данных проводили, используя программы Microsoft Excel и Statistica 6.0.

Проведенное исследование показало, что хуже всего к почвенным условиям адаптируется клон Pt: уже сразу после пересадки в почву, в течение первых двух недель, погибло более 40% растений (рисунок). За этот же период гибель растений клонов 215 и V22 составила примерно 20 и 15% соответственно. Такая же тенденция наблюдалась и на протяжении всего изученного периода адаптации, и через два месяца выжило лишь 22,7% растений клона Pt. В два раза больше адаптированных растений было получено у клона V22 (52,1%). Лучший показатель адаптации у растений клона 215, он составил 69% выживших растений к концу второго месяца роста в почвенных условиях. Исходя из полученных данных пришли к выводу, что следует увеличить период адаптации при повышенной влажности (80–90%) до трех-четырех недель, чтобы фотосинтетический аппарат и корневая система регенерантов успела в большей степени адаптироваться к условиям *ex vitro*.

Таблица 1

Состав водной вытяжки субстрата для адаптации

pH <sub>KCl</sub>	H <sub>г</sub> , %	N <sub>общ</sub> , %	P <sub>общ</sub> , %	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , мг/100 г	Гумус (почва), % С (торф), %	N <sub>легк</sub> , мг/100 г	Ca + Mg, мг-экв/100 г	Ca, мг-экв/100 г	Mg, мг-экв/100 г
6,1	86,70	0,917	0,035	11,66	40,92	54,53	2,76	2,27	0,49



Сохранность регенерантов 3 клонов осины в разные периоды адаптации *ex vitro*

Для определения влияния такого фактора, как количество корней, на адаптацию растения внутри каждого клона были разбиты на группы, отличающиеся в момент посадки по количеству корней – без корней, от 1 до 3 корней, больше 3 корней (табл. 2).

Для определения влияния высоты на адаптацию растения внутри каждого клона были разбиты на группы, отличающиеся в момент посадки по высоте стволика – ниже 1 см, от 1 до 3 см, выше 3 см (табл. 3).

Таблица 2

Сохранность микроклональных растений осины и березы в зависимости от первоначального количества корней при посадке в условия *ex vitro*

Клон	Количество корней у растений <i>in vitro</i>	Сохранность, %		
		0,5 месяца	1 месяц	2 месяца
Pt	0	40,0	10,0	10,0
	1–3	63,5	31,1	27,0
	>3	57,1	14,3	14,3
	0	75,0	75,0	75,0
215	1–3	79,8	70,2	67,9
	>3	83,3	75,0	75,0
	0	76,9	51,3	46,2
V22	1–3	90,9	56,4	54,5
	>3	100,0	66,7	66,7
	0	62,5	45,8	45,8
Береза	1	93,3	73,3	68,9
	2	96,7	83,3	80,0
	>3	100,0	100,0	80,0

Наибольшая сохранность наблюдалась у растений, у которых количество корней при посадке составило больше 3 – 80% к концу второго месяца адаптации. У растений при посадке без корней к концу второго месяца адаптации сохранность составила всего 45,8%, а у растений с одним корнем при посадке – 68,9%.

Таблица 3

Сохранность микроклональных растений осины и березы в зависимости от первоначальной высоты стволика при посадке в условия *ex vitro*

Клон	Высота стволика растений <i>in vitro</i> , см	Сохранность, %		
		0,5 месяца	1 месяц	2 месяца
215	<1	75,0	75,0	75,0
	1–3	80,2	72,8	70,4
	>3	90,0	90,0	90,0
Pt	<1	0,0	0,0	0,0
	1–3	64,5	37,1	32,3
	>3	48,1	11,1	11,1
V22	<1	75,0	62,5	62,5
	1–3	87,9	57,6	54,5
	>3	81,8	45,5	40,9
Береза	<1	93,3	73,3	68,9
	1–3	96,7	83,3	80,0
	>3	100,0	100,0	80,0

Наибольший процент сохранности приходился на группу растений с первоначальной высотой стволика 1–3 см и больше 3 см. У клона 215 наблюдалось 90% сохранности у растений с первоначальной высотой стволика больше 3 см, у растений клона Pt с первоначальной высотой стволика 1–3 см сохранность составила 32,3%. В то же время у клона V22 наибольший процент сохранности наблюдался в группе

растений, у которых первоначальная высота при посадке составила менее 1 см (62,5%). У всех клонов наблюдалась тенденция к увеличению доли выживших растений с большей высотой стволика.

Аналогично у клона березы – большая сохранность у растений с первоначальной высотой стволика 1–3 см и выше 3 см (80% сохранности в обеих группах).

**Заключение.** Исходя из результатов проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1) размер растений для пересадки в почвенный субстрат должен составлять 3 см;

2) оптимальное количество корней у растений для пересадки в почвенный субстрат – 2 и более;

3) по особенностям развития растений в стерильных условиях можно прогнозировать их развитие при выращивании в условиях *ex vitro*, клон с наиболее развитой надземной частью будет превосходить по росту остальные клоны на протяжении всего периода адаптации;

4) первый период адаптации растений (при повышенной влажности) должен продолжаться до 3 недель.

#### Литература

1. Гольшклина, Л. В. Роль сортов и новых технологий в интенсивном садоводстве / Л. В. Гольшклина // Садоводство и виноградарство. – 2003. – № 6. – С. 23.

2. Сидорович, Е. А. Клональное микроразмножение новых плодово-ягодных растений:

методы регенерации растений в культуре *in vitro*, генетической стабильности материала / Е. А. Сидорович, Е. Н. Кутас. – Минск: Навука і тэхніка, 1996. – 245 с.

3. Микрклональное размножение вишни / В. В. Фаустов [и др.] // Изв. ТСХА. – 1988. – Вып. 5. – С. 131–148.

4. Судейная, С. В. Испытание ионообменных смол в качестве субстратов при вегетативном размножении перспективных сортов *Ribes nigrum* L. / С. В. Судейная, Л. Б. Утыро // Обогащение и сохранение генофонда на основе повышения биологического потенциала растительных ресурсов: науч. тр. / Белорус. пед. гос. ун-т им. М. Танка; редкол.: И. Э. Бученков (отв. ред.) [и др.]. – Минск: БГПУ им. М. Танка, 2000. – С. 89–92.

5. Манжелесова, Н. Е. Взаимодействие эпибрассинолида и феруловой кислоты в процессах формирования семян ячменя / Н. Е. Манжелесова // Регуляция роста, развития и продуктивности растений: материалы Междунар. науч. конф., Минск, 9–11 нояб. 1999 г. / НАН Беларуси, Ин-т экспер. ботаники, Белорус. общ-ное об-ние физиологов растений; редкол.: Н. А. Ламан [и др.]. – Минск, 1999. – С. 72–73.

6. Красинская, Т. А. Укоренение *in vitro* и *ex vitro* подвоя вишни и черешни / Т. А. Красинская // Наука и инновации. – 2008. – № 6 (64). – С. 42–45.

Поступила 14.04.2010