

УДК 630*161.16:581.14

М. А. Кодун-Иванова

Институт леса Национальной академии наук Беларуси

**ПОКАЗАТЕЛИ ВОДНОГО СТРЕССА МИКРОКЛОНАЛЬНО
РАЗМНОЖЕННЫХ РАСТЕНИЙ ОСИНЫ *POPULUS TREMULA*
ПРИ ИХ ВЫРАЩИВАНИИ В УСЛОВИЯХ *EX VITRO***

В данной статье описываются морфофизиологические показатели водного стресса микроклонально размноженных растений осины *Populus tremula* после пересадки их в нестерильных условиях закрытого грунта *ex vitro*. В течение двух месяцев через каждые две недели регистрировали показатели следующих параметров: высоту стволика, площадь листа, приживаемость, влажность листа, содержание воды в листьях, водный дефицит, скорость влагопотери, содержание сухого вещества, интенсивность транспирации, размер и количество устьиц, содержание хлорофиллов *a*, *b* и каротиноидов. Установлено, что максимальный водный стресс микроклональные растения осины испытывают в первый месяц адаптации, в течение этого периода наблюдается максимальная интенсивность транспирации, скорость влагопотери и водный дефицит. В течение первого месяца растения успевают адаптироваться к новым условиям влажности воздуха, после чего их можно переносить в условия закрытого грунта лесных питомников для доращивания. В первый месяц адаптации следует поддерживать высокую влажность воздуха, постепенно снижая ее с уровня 90–95% до 50%. Полученные данные позволяют усовершенствовать методические рекомендации по выращиванию посадочного материала микроклонально размноженной осины и существенно сэкономить на производстве.

Ключевые слова: адаптация, *ex vitro*, осина, стресс, устьица, интенсивность транспирации, влажность, хлорофилл.

M. A. Kodun-Ivanova

Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus

**INDICATORS OF WATER-STRESS OF MICROCLONAL ASPEN
POPULUS TREMULA TO THE *EX VITRO* CONDITIONS**

This article describes the morphophysiological indices of the water stress of microclonal plants of the aspen *Populus tremula* after transplanting to the *ex vitro* conditions. Within two months, the parameters of the following were recorded every 2 weeks: height, leaf area, survival rate, leaf moisture, water content in leaves, water deficiency, moisture loss rate, dry matter content, transpiration rate, size and number of stomata, the content of Chlorophylls *a*, *b* and Carotenoides. It has been established that the maximum water stress in microclonal plants of aspen is tested in 1 month of acclimation, during this period the maximum intensity of transpiration, the rate of moisture loss and water deficiency are observed. During this period, plants have time to adaptation to the new conditions of air humidity, after which they can be transferred to the conditions of the closed soil of forest nurseries for cultivation. In the first month of adaptation it is necessary to maintain high humidity of air, gradually reducing it from of 90–95% to the level 50%. The obtained data will allow improving the methodological recommendations for growing the planting material of microclonal propagated aspen and substantially saving on production.

Key words: adaptation, *ex vitro*, aspen, stress, stomata, transpiration intensity, humidity, chlorophyll.

Введение. Плантационное лесовыращивание имеет огромное значение в лесном хозяйстве разных стран мира, так как специализированные плантации для получения древесного сырья заданного качества в большем количестве и в сокращенные сроки получают множество преимуществ по сравнению с многоцелевыми лесами искусственного и естественного происхождения и требуют использования большого количества высококачественного посадочного материала, одним из вариантов получения которого является метод клонального микроразмножения. Данный метод вегетативного размноже-

ния состоит из нескольких последовательных стадий в лабораторных условиях *in vitro*, в результате получается большое количество посадочного материала, который нужно адаптировать к нестерильным условиям *ex vitro*. Возврат растений в естественную среду произрастания сопровождается значительным стрессом, так как они должны приспособиться к новым экологическим условиям. Трудности адаптации *ex vitro* являются ограничивающим фактором развития регенерантов при их промышленном выращивании. Рядом ученых было установлено, что адаптация растений к условиям

ex vitro – обязательная стадия клонального микроразмножения, являющаяся заключительной и стрессовой для пробирочных растений, и определяющая успех всей работы [1, 2]. Установление особенностей роста в данный период является важной задачей для разработки технологии выращивания быстрорастущих лесных древесных видов биотехнологическими методами.

Основная часть. Основной причиной анатомических, морфологических и физиологических отклонений в строении и развитии микроклонально размноженных растений является их специфический морфотип в условиях *in vitro*, отличающихся от нестерильных условий *ex vitro*. Растения *in vitro* должны адаптироваться к условиям пониженной влажности, высокой интенсивности и качественному составу света, новым условиям получения источника углерода, патогенной микрофлоре почвы и окружающей среды. Вышеперечисленные условия существенно отличаются от культивирования в пробирке, где устанавливается повышенная влажность, дефицит углекислого газа, все питательные вещества находятся в агарозном субстрате, в том числе источник углерода – сахара. Также после пересадки в почву должны настроиться водообмен и транспирация растений. Структурные изменения, такие как количество и размер устьиц, форма и волнистость клеточных стенок паренхимы, демонстрируют фенотипическую пластичность в результате смены условий *in vitro* на тепличных [3]. Количество устьиц на абаксиальной стороне листа увеличено, как и их апертура и размеры замыкающих клеток, что в естественных условиях не наблюдается. Устьичный аппарат в условиях *in vitro* не функционирует, и устьица представляют собой промежуточную стадию между формами *in vitro* и *ex vitro* [4, 5]: при переносе растений в фитотрон или в полевые условия происходят изменения в морфологии листа, устьица на новообразованных листьях приобретают достаточное сходство с устьицами растений в полевых условиях [5, 6, 7]. Возрастное устьичной резистентности у вновь образовавшихся листьев микроклонально размноженных растений вызывает фитогормон абсцизовая кислота (АБК), который считается гормоном стресса [8]. Существует два пути образования АБК – из мевалоновой кислоты и путем распада каротиноидов в листьях [8]. АБК тормозит рост растений, снижает транспирацию, ингибирует действие другого гормона ИУК (индолилуксусной кислоты) на усиление роста растяжением, ускоряет распад зеленых пигментов клетки (хлорофилл *a* и *b*, их соотношение) [8]. Замедленный рост, пониженное содержание зеленых и желтых пигментов, больший размер

и количество устьиц, а также рост делением клеток может указывать на повышенное содержание в тканях АБК и тем самым регистрировать стрессовое состояние у растений.

Интенсивность транспирации и содержание влаги в растении напрямую зависят от структуры мезофилла листа и степени его витрифицированности, а также гормональной регуляции растения и устьичного аппарата. Поскольку одним из лимитирующих факторов при выращивании растений в условиях *ex vitro* выступает атмосферная влажность воздуха, то изучение влияния ее на развитие регенерантов осины является актуальной задачей. После пересадки в грунт в связи с уменьшением атмосферной влажности индуцируется влагоперенос, активизируются процессы растяжения и дифференциации растительных структур, восстанавливаются системы поддержания тургора, а также функционирование устьиц.

Целью данного исследования стало выявление максимального стрессового периода и его продолжительности у микроклонально размноженных растений осины *Populus tremula* при адаптации к условиям *ex vitro*; изучение проявлений водного стресса у микроклонально размноженной осины после пересадки в условия *ex vitro*.

Растительный материал для анализа отбирался у клона осины V22 на следующих этапах:

- 1) непосредственно перед посадкой в условия *ex vitro* из условий *in vitro* (влажность воздуха в условиях *in vitro* составляет около 95–99%, в условиях *ex vitro* – 90–95%);
- 2) спустя 0,5 мес. после посадки в условия *ex vitro* (влажность воздуха снижают до 75–85%);
- 3) спустя 1 мес. после посадки в условия *ex vitro* (влажность воздуха снижают до 50–55%, увлажнитель отключен);
- 4) спустя 1,5 и 2 мес. после посадки в условия *ex vitro* (влажность воздуха колеблется от 30 до 40%).

Адаптация растений проходила в течение 2 мес. в лабораторных условиях с освещением 2,8 тыс. люкс (фитолампы OSRAM L36W/77 Fluora), фотопериодом 10/14. Ячейки объемом 70 мл заполняли торфом верховым с песком (смесь в соотношении 3 : 1), нераскисленным, автоклавированным. Увлажнение воздуха происходило посредством бытового увлажнителя, полив осуществлялся по мере подсыхания субстрата. В качестве биометрических параметров измеряли высоту стволика, площадь одного листа (3-й лист от верха), рассчитывали отношение количества междоузлий к высоте как показатель роста. Уровень влагопотери (косвенный показатель тургора) рассчитывали с помощью относительного содержания воды (RWC, %) и водного дефицита (WD, %) по методике,

описанной в [9, 10]. Также рассчитывали содержание сухого вещества (ДМС, %). Интенсивность транспирации и динамику изменения влажности листа определяли по методике [11], производя замеры через каждые 10 мин в течение часа. Также рассчитывали общую скорость потери влаги в листе за час. Площадь листовых пластинок (LA , cm^2) находили с помощью специализированного программного обеспечения по общедоступной методике [12]. Для установления адаптационной способности регенерантов к новым условиям влажности воздуха также подсчитывали количество устьиц в 1 мм^2 и размер замыкающих клеток устьиц [13]. Для изучения физиологических изменений производили замер количественного содержания пигментов в листьях регенерантов. Содержание зеленых и желтых пигментов (хлорофилл a , хлорофилл b , суммарный хлорофилл ($a + b$), каротиноиды) определяли по Wintermans, De Motts [14, 15]. Образцы для анализа в микроколичествах ($1,5\text{--}5,5$ мг сырого веса) подвергали растиранию в 96%-ном спирте высшей очистки с добавлением небольшого количества мела $CaCO_3$ и оставляли в темном месте на 24 ч для полной экстракции пигментов в раствор при температуре $3\text{--}5^\circ C$. Затем раствор центрифугировали в течение 5 мин на скорости 13 000 об/мин, отбирали центрифугат и доводили

раствор спиртом до 2 мл, далее определяли концентрацию пигментов в центрифугате на длинах волн 440, 649, 654, 665 нм на спектрофотометре марки UV-1601 (производства SHIMADZU). Взвешивание растительной массы проводили на аналитических весах RADWAG AS/110/C/2.

Статистическую обработку данных выполняли, используя программы Microsoft Excel. При проверке статистических гипотез применяли 5%-ный уровень значимости в программе ПСП Statistica 7.0 (StatSoft Inc., 1984–2004). Построение графиков проводили в программе Statistica 7.0 (вертикальные линии – доверительный интервал) [16].

Транспирация происходила намного интенсивнее в течение 1 мес. после посадки в условия *ex vitro* (рис. 1).

Ко второму месяцу адаптации за 60 мин пассивной транспирации ее интенсивность остается приблизительно на одном уровне. Учитывая, что с течением времени влажность воздуха постепенно снижали, можно предположить, что именно это мероприятие помогло добиться снижения интенсивности транспирации за 1 мес. выращивания в условиях *ex vitro*. Одновременно с интенсивностью транспирации производились измерения влажности листа (в процентах) (рис. 2).

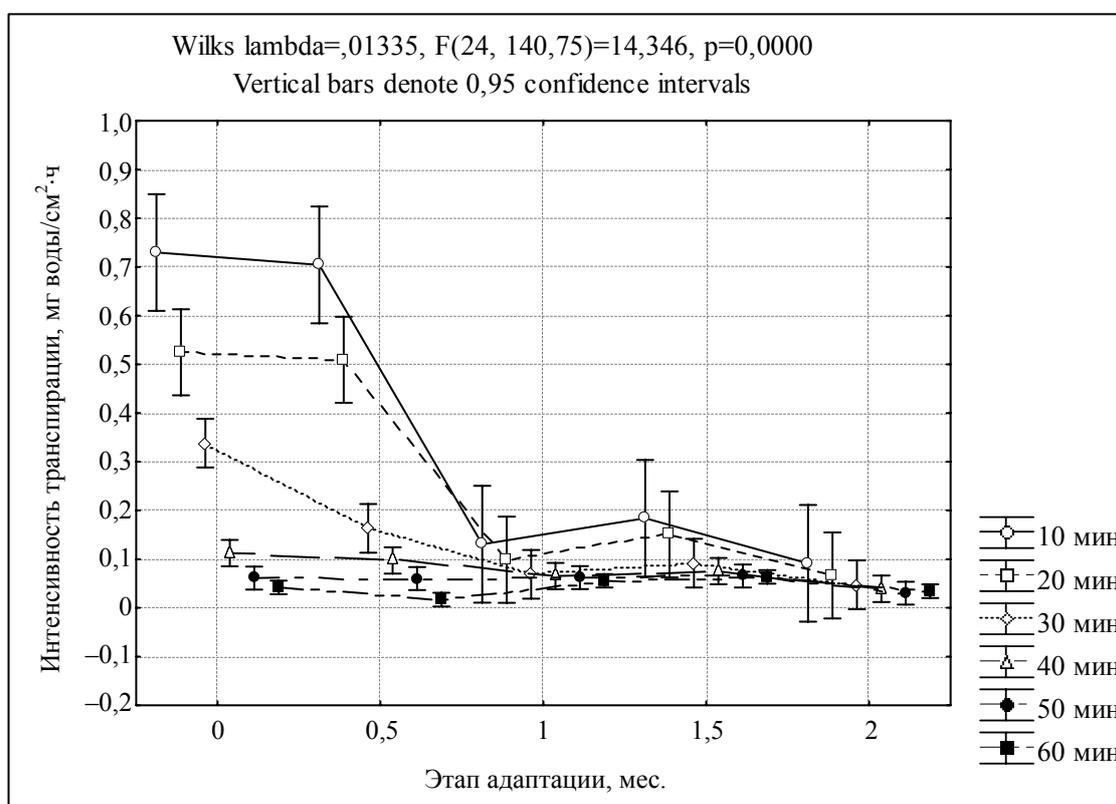


Рис. 1. Интенсивность транспирации воды на площадь поверхности листа микроклональной осины в течение 2 мес. адаптации

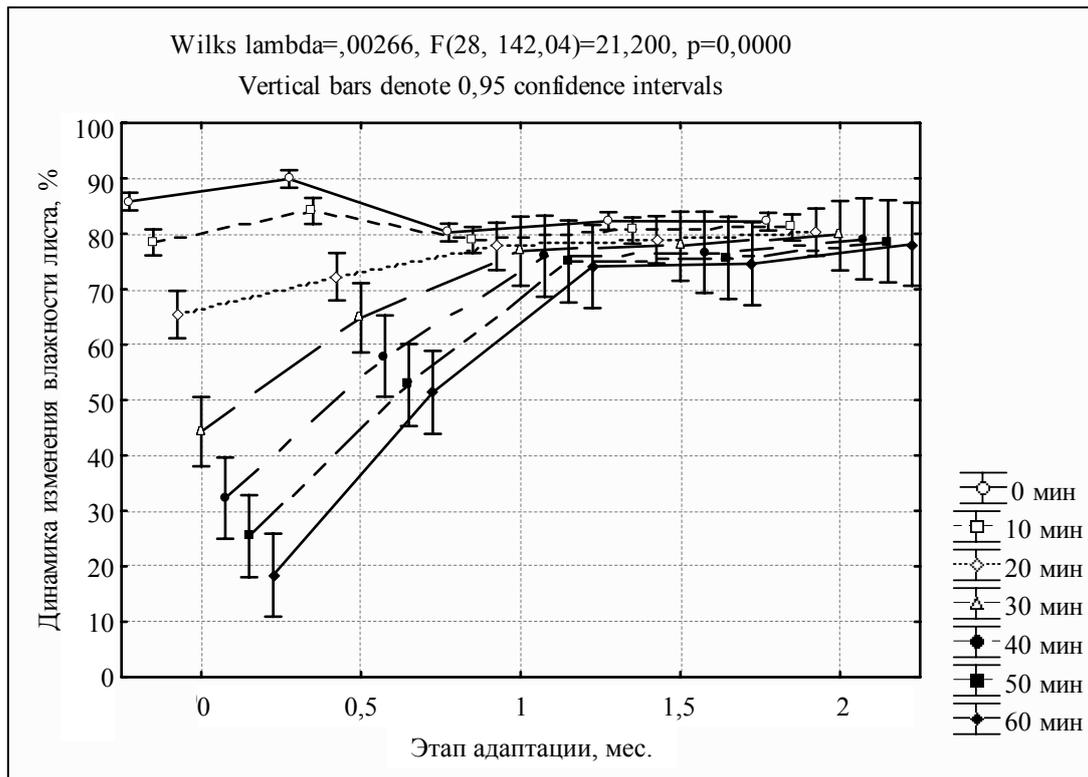


Рис. 2. Динамика изменения влажности листа микроклонально размноженной осины за период измерений 60 мин в течение 2 мес. адаптации

Проведенные исследования показали, что изменение влажности листа на этапе перед посадкой, т. е. в условиях *in vitro*, на графике выглядит очень резко снижающейся кривой – за 60 мин влажность падает от 86 до 18%. Это косвенно подтверждает витрификацию листьев у растений, которые длительно культивируют *in vitro*. Витрифицированные листья не содержат нормальный мезофилл листа, несмотря на высокое содержание воды, поэтому не имеют возможности удерживать ее в тканях листа. Спустя 1 мес. роста при постепенном снижении атмосферной влажности воздуха можно наблюдать, что мезофилл листа хорошо удерживает внутреннюю влагу, за 1 ч влажность листа падает с 80 до 74%. Интенсивность транспирации, а также способность мезофилла листа удерживать внутреннюю влагу напрямую зависят от устьичного аппарата, который является регулятором транспирации и водообмена и представляет собой основную часть верхнего концевое двигателя растения (ВКД) [8]. Регуляция осуществляется как количеством устьиц на площадь листа, так и размерами замыкающих клеток устьиц. Кроме водообмена, устьица регулируют и газообмен между листом и атмосферой. Согласно закону Й. Стефана и Б. И. Срезневского, скорость диффузии газов пропорциональна не площади отверстия, а периметру окружности, поэтому испарение воды (водяного пара) через многочисленные устьица

происходит очень интенсивно [17]. В результате проведенных исследований было установлено, что количество устьиц к концу первого месяца адаптации снижается почти вдвое – с $248 \pm 11,5$ шт./мм² до $167 \pm 4,6$ шт./мм² (рис. 3). Размеры замыкающих клеток устьиц при этом незначительно изменяются спустя 2 недели адаптации – с $2,4 \pm 0,1$ мкм до $2,0 \pm 0,1$ мкм, а к периоду адаптации 1 мес. размеры снова достигают начальных значений – $2,4 \pm 0,1$ мкм.

Ко второму месяцу адаптации количество устьиц снова нарастает до $247 \pm 7,1$ шт./мм², а размеры замыкающих клеток устьиц значительно уменьшаются до $1,6 \pm 0,1$ мкм. Таким образом, мы не наблюдаем четкой связи между периодом адаптации, интенсивностью транспирации, влажности листа и устьичными характеристиками, что, вероятнее всего, связано с наличием еще одного элемента транспирации и верхнего концевое двигателя – кутикулярной транспирацией. У молодых листьев кутикулярная транспирация составляет около половины всей транспирации [8]. Мы не изучали кутикулярную транспирацию, а также не исследовали клеточные стенки эпидермиса листьев, а так как подсчет количества устьиц и изучение их размера проводили на третьем хорошо развитом вновь образованном листе от верха растения, возможно, поэтому мы наблюдали такое несоответствие интенсивности транспирации и устьичных характеристик.

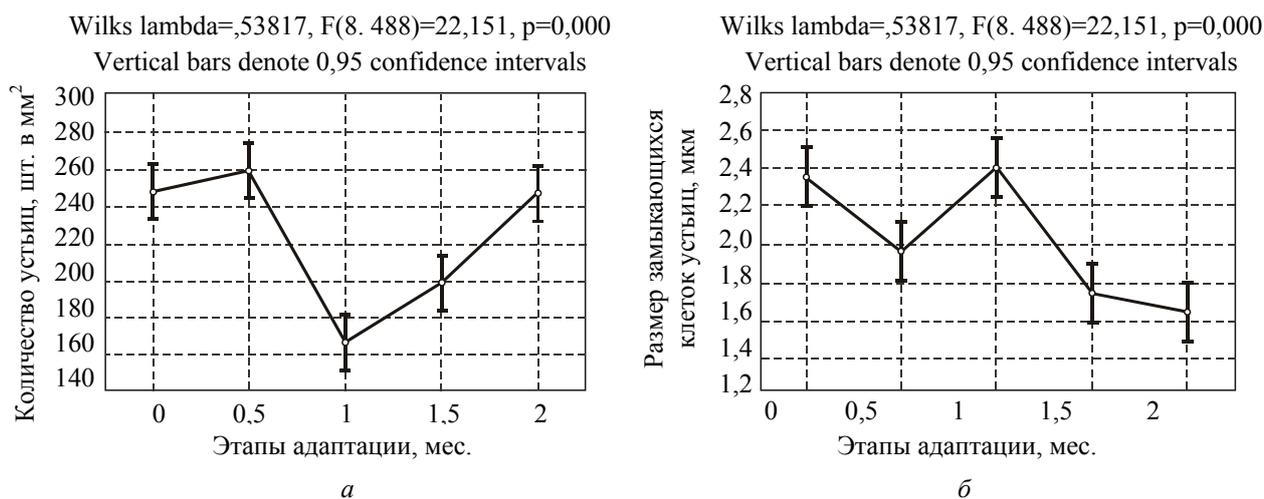


Рис. 3. Количество устьиц (А), шт./мм² поверхности листа и размер их замыкающихся клеток (Б), мкм, в течение 2 мес. адаптации

Стоит отметить, что в ранее проведенных опытах устьичные характеристики отличаются большей стабильностью. Во время 1 мес. адаптации их количество максимально, но с течением времени при изменяющихся условиях – в закрытом грунте и в лесных культурах – их количество снижалось и оставалось стабильным [18].

Мы проанализировали, как с течением периода адаптации изменяется относительное содержание воды в листьях (RWC), водный дефицит (WD), содержание сухого вещества (DMC), морфофизиологические и биометрические параметры (табл. 1).

Было установлено, что максимальный водный дефицит растения испытывают в течение первых двух недель адаптации, он достигает 27,8%, а к концу второго месяца адаптации падает до 8%. При этом относительное содержание воды в листьях минимальное через полмесяца адаптации – 67,7%.

Параметр DMC отражает накопление пластических веществ в растениях и в целом сильно не колеблется, только ко второй неделе адаптации данный показатель возрастает с 14,7 до 20,6%, амплитуда его колебания составляет всего 6%.

Высокая скорость влагопотери наблюдается и на начальном этапе еще до пересадки в условия *ex vitro* – 6,01 мг воды/ч и достигает максимума через полмесяца адаптации – 9,17 мг воды/ч. Динамика изменения данного параметра подтверждает теорию о витрифицированных микроклональных растениях осины *in vitro*.

Содержание и хлорофиллов *a* и *b*, и каротиноидов к первому месяцу адаптации постепенно повышается, а ко второму месяцу адаптации падает почти до начального уровня. В условиях *in vitro* содержание пигментов возможно находится в равновесии, качество света особой роли не будет играть, а вот наличие темного периода *ex vitro* может сильно повлиять на содержание хлорофилла *b*.

Таблица 1

Изменение морфофизиологических параметров микроклональной осины в течение адаптации

Параметр	Этап адаптации, мес.				
	0	0,5	1	1,5	2
WD, %	8,3	27,8	12	13	8,2
RWC, %	90,4	67,7	85,7	84,7	90,3
DMC, %	14,7	20,6	16,7	17,8	17,1
Скорость влагопотери, мг/ч	6,01	9,17	1,18	1,69	1,06
Содержание хл. <i>a</i> , мг/г	0,504 ± 0,033	0,601 ± 0,032	0,684 ± 0,014	0,581 ± 0,020	0,488 ± 0,011
Содержание хл. <i>b</i> , мг/г	0,157 ± 0,015	0,186 ± 0,015	0,222 ± 0,025	0,076 ± 0,010	0,152 ± 0,007
Содержание карот. мг/г	0,202 ± 0,009	0,226 ± 0,009	0,242 ± 0,012	0,212 ± 0,006	0,195 ± 0,004
Отношение хлорофилла <i>a</i> / <i>b</i>	3,46	3,39	3,33	10,45	3,24
Отношение (<i>a</i> + <i>b</i>)/карот.	3,28	3,47	3,92	3,09	3,29
Средняя высота стволика, см	3,1 ± 0,1	3,5 ± 0,1	5,1 ± 0,2	8,2 ± 0,3	12,3 ± 0,4
Междоузлие/высота	2,2	2,1	2,2	1,8	1,3
Средняя LA _{листа} , см ²	0,017 ± 0,001	0,791 ± 0,016	1,832 ± 0,043	7,032 ± 0,221	11,081 ± 0,469
Приживаемость, %	100	95	85	83	83

Параметр отношение хлорофиллов a/b в данном случае будет важной адаптационной характеристикой. В условиях *in vitro*, где темновой фазы не наблюдается, отношение хлорофиллов a/b составляет 3,46. Затем этот показатель постепенно падает и в конце второго месяца адаптации составляет 3,29, что может указывать на постепенную адаптацию и к новому фотопериоду, и в целом к новым условиям выращивания на физиологическом уровне. Отклонение в данном параметре при замере через 1,5 мес, составившем 10,45, можно объяснить временным изменением фотопериода перед замером – фотопериод в течение 2 дней составлял 24 световых часа, и среднее содержание хлорофилла b составило $0,076 \pm 0,010$ мг/г сырого веса, что, соответственно, повлияло на отношение хлорофиллов a/b .

Важным параметром, определяющим стрессовое состояние у растений, является отношение зеленых пигментов к каротиноидам – чем оно меньше, тем в более стрессовом состоянии может находиться растение, поскольку содержание каротиноидов напрямую зависит от гормона стресса – абсцизовой кислоты [8]. К первому месяцу адаптации данный показатель возрастает с 3,28 (начальное равновесное состояние) до 3,92, в этап адаптации 1,5 мес. данный параметр резко падает до 3,09, вероятно, это состояние также может быть вызвано 24-часовым световым фотопериодом в течение двух дней перед замером. Затем вышеназванный показатель достигает значения, приблизительно одинакового с начальным замером – 3,29. За период адаптации параметр отношение количества междоузлий к высоте снижается с 2,2 до 1,3, это указывает на то, что характер роста растений изменяется с роста за счет деления клеток на рост за счет их растяжения. Средняя высота стволика постепенно растет с $3,1 \pm 0,1$ см до $12,3 \pm 0,4$ см, а средний прирост составил за 2 мес. – $9,2 \pm 0,3$ см.

Для более полного анализа всех изученных в период 2 мес. адаптации параметров мы исследовали корреляционные связи между ними (табл. 2).

В результате была установлена высокая и очень высокая положительная связь между относительной влажностью воздуха и следующими параметрами: скорость влагопотери ($r = 0,82$), интенсивность транспирации и приживаемость ($r = 0,97$ и $r = 1,00$); отрицательная связь между относительной влажностью воздуха и влажностью листа ($r = -0,98$), приростом по высоте ($r = -0,87$), средней площадью листа и средней высотой стволика ($r = -0,80$). Скорость влагопотери напрямую связана высокой

связью с интенсивностью транспирации ($r = 0,90$), водным дефицитом ($r = 0,72$), приживаемостью ($r = 0,85$) и обратно связана с содержанием воды в листьях, средней высотой и влажностью листа ($r = -0,71$). При этом между скоростью влагопотери и размером устьиц связь отсутствовала, а между количеством устьиц установлена значительная положительная связь ($r = 0,67$).

Между размером и количеством устьиц и относительной влажностью воздуха установлена значительная положительная связь ($r = 0,58$ и $r = 0,54$). Между влажностью воздуха и относительным содержанием воды в листьях, водным дефицитом, содержанием сухого вещества и фотосинтетических пигментов связи не было установлено.

Между фотосинтетическими параметрами и относительной влажностью воздуха, и, соответственно, этапами адаптации, связь отсутствует. Заметна высокая связь между содержанием хлорофилла a и каротиноидами ($r = 0,98$), а также количеством устьиц ($r = -0,73$). Между хлорофиллом b и такими параметрами, как содержание каротиноидов, площадь листа, прирост по высоте и размер устьиц отмечена значительная связь: $r = 0,59$; $r = -0,50$; $r = -0,56$ и $r = 0,65$ соответственно. Содержание каротиноидов связано значительной связью со средней высотой, площадью листа, размером и количеством устьиц, а также с отношением количества междоузлий к высоте ($r = -0,51$; $r = -0,54$; $r = 0,52$; $r = -0,62$ и $r = 0,64$ соответственно).

Приживаемость высокой и очень высокой положительной связью связана со скоростью влагопотери и интенсивностью транспирации ($r = 0,85$ и $r = 0,98$), и высокой отрицательной связью с влажностью листа и приростом ($r = -0,97$ и $r = -0,85$). С размером и количеством устьиц установлена значительная положительная связь ($r = 0,53$ и $r = 0,58$).

Практически между всеми биометрическими параметрами установлена высокая и очень высокая связь, например, высота стволика связана положительной связью с площадью листа ($r = 0,99$), влажностью листа ($r = 0,74$), а отрицательной – с интенсивностью транспирации ($r = -0,80$), размером устьиц ($r = -0,78$).

Характер роста (отношение количества междоузлий к высоте стволика) связан значительной связью с относительной влажностью воздуха ($r = 0,65$), что и предполагалось, скоростью влагопотери, содержанием хлорофилла a , каротиноидов, приживаемостью, влажностью листа и интенсивностью транспирации, а высокой и очень высокой связью – с площадью листа, приростом по высоте и размером устьиц.

Таблица 2

Корреляционная матрица морфофизиологических и биометрических параметров микроклонально размноженной осины при адаптации в условиях *ex vitro* (2 мес.)

Параметр	Значение коэффициента корреляции r между разными параметрами																		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₁₄	X ₁₅	X ₁₆	X ₁₇	X ₁₈	
X ₁ Влажность воздуха	1,00																		
X ₂ WD	0,24	1,00																	
X ₃ RWC	-0,22	-1,00	1,00																
X ₄ DMC	-0,17	0,90	-0,90	1,00															
X ₅ Скорость влагопотери	0,82	0,72	-0,71	0,42	1,00														
X ₆ Содержание хл. <i>a</i>	-0,21	0,41	-0,42	0,33	-0,07	1,00													
X ₇ Содержание хл. <i>b</i>	0,28	0,22	-0,22	0,04	0,22	0,46	1,00												
X ₈ Содержание карот.	-0,06	0,48	-0,49	0,35	0,08	0,98	0,59	1,00											
X ₉ Отношение хлор. <i>a</i> / <i>b</i>	-0,44	-0,05	0,05	0,11	-0,31	0,07	-0,86	-0,10	1,00										
X ₁₀ Отношение (<i>a</i> + <i>b</i>)/карот.	0,01	0,15	-0,16	0,03	-0,07	0,75	0,90	0,82	-0,57	1,00									
X ₁₁ Средняя высота	-0,80	-0,44	0,43	-0,02	-0,71	-0,40	-0,42	-0,51	0,23	-0,35	1,00								
X ₁₂ Междоузлия/высота	0,65	0,33	-0,32	-0,07	0,50	0,56	0,44	0,64	-0,15	0,48	-0,96	1,00							
X ₁₃ Средняя LA _{листа}	-0,80	-0,40	0,39	0,03	-0,67	-0,42	-0,50	-0,08	0,32	-0,43	0,99	-0,97	1,00						
X ₁₄ Приживаемость	1,00	0,27	-0,26	-0,12	0,85	-0,23	0,25	-0,08	-0,42	-0,05	-0,79	0,62	-0,78	1,00					
X ₁₅ Прирост по высоте	-0,87	-0,32	0,32	0,11	-0,69	-0,29	-0,56	-0,43	0,46	-0,43	0,96	-0,92	0,98	0,98	1,00				
X ₁₆ Влажность листа	-0,98	-0,06	0,04	0,34	-0,71	0,32	-0,14	0,19	0,33	0,14	0,74	-0,60	0,72	-0,97	0,80	1,00			
X ₁₇ Интенсивность трансп.	0,97	0,39	-0,37	0,00	0,90	-0,20	0,11	-0,07	-0,25	-0,16	-0,80	0,63	-0,77	0,98	-0,80	-0,94	1,00		
X ₁₈ Размер устьиц	0,580	-0,08	0,08	-0,45	0,22	0,43	0,65	0,52	-0,46	0,65	-0,78	0,86	-0,83	0,53	-0,85	-0,56	0,43	1,00	
X ₁₉ Количество устьиц	0,54	0,28	-0,26	0,21	0,67	-0,73	-0,09	-0,62	-0,35	-0,50	-0,03	-0,24	0,00	0,58	-0,11	-0,51	0,58	-0,31	1,00

Примечание. $r = 0,901-0,999$ – связь очень высокая; $r = 0,701-0,900$ – связь высокая; $r = 0,501-0,700$ – связь значительная; $r = 0,301-0,500$ – связь слабая; $r = 0-0,300$ – связь отсутствует (в соответствии со шкалой Чеддока).

Стоит отметить, что прирост по высоте стволика связан высокой отрицательной связью с размером устьиц ($r = -0,85$), а размер устьиц, помимо вышеописанных связей, значительно связан с отношением суммы хлорофиллов к каротиноидам и влажностью листа ($r = 0,65$ и $r = -0,56$). На количество устьиц значительно влияет влажность листа и интенсивность транспирации ($r = -0,51$ и $r = 0,58$ соответственно).

Между многими параметрами были установлены связи, что подтверждает литературные данные, например, высокая положительная связь между влажностью воздуха, скоростью влагопотери, интенсивностью транспирации и устьичными характеристиками. Однако, мы не предполагали отсутствие связи между количеством и размером устьиц, между влажностью воздуха и водным дефицитом, между приживаемостью, влажностью воздуха и отношением хлорофиллов к каротиноидам. Возможно, что для анализа связи между фотосинтетическими параметрами следует учитывать и слабые связи с коэффициентом корреляции от 0,300 до 0,500, поскольку содержание хлорофилла и каротиноидов очень нестабильно и может меняться весьма быстро.

Между параметром отношение хлорофиллов к каротиноидам (показатель стресса) и другими параметрами связь либо слабая, либо вообще отсутствует, исключение – размер и количество устьиц, там связь значительная. Это указывает на то, что размер и количество устьиц косвенно являются показателями водного стресса, как и высота стволика.

Заключение. Таким образом, приживаемость и прирост по высоте микроклонально

размноженных растений осины в начале адаптации зависят от уровня влажности воздуха, которая влияет на интенсивность транспирации и скорость влагопотери. Прирост по высоте напрямую зависит от развития листьев, их влажности и площади. При недостаточно высокой влажности воздуха сразу после посадки в условия *ex vitro* микроклональные растения, не приспособленные к иному уровню транспирации, слишком быстро теряют тургор и увядают. Характер роста растений изменяется с роста за счет деления клеток на рост за счет их растяжения, и связан с площадью листа, приростом и размером устьиц. Скорость влагопотери напрямую связана с интенсивностью транспирации, водным дефицитом и приживаемостью. Установлено, что размер и количество устьиц может являться косвенным показателем стресса у микроклональной осины на этапе адаптации.

Исходя из всех вышеперечисленных результатов исследования можно сделать вывод, что для микроклональных растений осины самым стрессовым периодом в процессе адаптации является первый месяц. В течение этого периода растения успевают адаптироваться к новым условиям влажности воздуха, после чего их можно переносить в условия закрытого грунта лесных питомников для доращивания.

В первый месяц адаптации следует поддерживать высокую влажность воздуха, постепенно снижая ее с 90–95% до уровня приблизительно 50%. Полученные данные позволят усовершенствовать методические рекомендации по выращиванию посадочного материала микроклонально размноженной осины и существенно сэкономить на производстве.

Литература

1. Кухарчик Н. В. Адаптация в нестерильных условиях регенерантов косточковых культур, выращенных *in vitro*: Материалы науч.-метод. конф. «Совершенствование сортимента и технологии возделывания косточковых культур», Орел, 14–17 июля 1998 г. / Рос. акад. с.-х. наук, Всерос. науч.-исслед. ин-т селекции плодовых культур; редкол.: В. С. Докукин (отв. ред.) [и др.]. 1998. С. 114–116.
2. Rohr R. Acclimatization of micropropagated forest trees // Acta Horticulturae [Electronic resource]. 2003. N 616. Mode of access: http://www.actahort.org/books/616/616_3.htm. Date of access: 28.01.09.
3. Brandão S., Graciano-Ribeiro D., Batista Teixeira J., Portes T. A., Augusto L. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi // Pesq. agropec. Bras. Brasília, 2006. Vol. 41, no. 2. P. 185–194.
4. Noe N., Bonini L. Leaf anatomy of highbush blueberry grown *in vitro* and during acclimatization to *ex vitro* conditions // Biologia Plantarum. 1996. Vol. 38, no. 1. P. 19–25.
5. Fabri A. Anatomical changes in persistent leaves of tissue cultured strawberry plants after removal from culture // Scientia Horticulturae. 1986. No. 28. P. 331–337.
6. Gilly C., Rohr R., Chamel A. Ultrastructure and radiolabelling of leaf cuticles from ivy (*Hedera helix* L.) plants *in vitro* and during *ex vitro* acclimatization // Ann. Bot. 1997. Vol. 80. P. 139–145.
7. Sutter E. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture // Journal Amer. Soc. hort. sci. 1998. Vol. 113. P. 234–238.
8. Полевой В. В. Физиология растений: учеб. М.: Высш. шк. 1989. 464 с.

9. Campos P. S. Effects of drought on photosynthetic performans and water relations of four Vigna genotypes // *Photosynthetica*. 1999. Vol. 36, no. 1–2. P. 79–87.

10. Yordanov I., Tsone T., Goltsev V., Kruleva L., Velikova V. Interactive effect of water deficit and high temperature on photosynthesis in sunflower and maize plants. Changes in the parameters of chlorophyll fluorescence induction kinetics and fluorescence quenching // *Photosynthetica*. 1997. Vol. 33. P. 391–402.

11. Физиология растений: сб. описаний лабораторных работ для подготовки дипломированного специалиста / сост. Т. К. Головки, Г. Н. Табаленкова. Сыктывкар: СЛИ, 2007. 36 с.

12. Уткин А. И., Ермолова Л. С., Уткина И. А. Площадь поверхности лесных растений: сущность, параметры, использование. М.: Наука, 2008. 292 с.

13. Sampson J. A method of replacing dry or moist surfaces for examination by light microscopes // *Nature*. 1961. Vol. 191. P. 932–933.

14. Wintermans J. F. G. M., De Mots A. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1965. Vol. 109. P. 448–453.

15. Wettstein D. Formula of chlorophyll determination // *Exp. Cell Res.* 1957. Vol. 12, no. 3. P. 427–487.

16. Жученко Ю. М. Статистическая обработка информации с применением персональных компьютеров. Гомель: ГГУ им. Ф. Скорины, 2007. 101 с.

17. Лебедев С. И. Физиология растений. 3-е изд., перераб. и доп. М.: Агропромиздат, 1988. 544 с.

18. Кодун-Иванова М. А. Изменения анатомических характеристик листьев микроклональных растений осины (*Populus tremula*) в процессе адаптации *ex vitro*: материалы Междунар. молодежной науч.-практ. конф. «Научные стремления – 2012», Минск. С. 255–258.

References

1. Kukharchik N. V. [Adaptation of regenerants of stone fruits grown in vitro under non-sterile conditions]. *Materialy nauch.-metod. konf. («Sovershenstvovaniye sortimenta i tekhnologii vozdeleyvaniya kostochkovykh kul'tur»)* [Materials of the scientific-methodical conference (“Improvement of assortment and technology of cultivation of stone fruit crops”)]. Orel, 1998, pp. 114–116 (In Russian).

2. Rohr R. Acclimatization of micropropagated forest trees. *Acta Horticulturae* [Electronic resource]. 2003, no. 616. Mode of access: http://www.actahort.org/books/616/616_3.htm. Date of access: 28.01.09.

3. Brandão S., Graciano-Ribeiro D., Batista Teixeira J., Portes T. A., Augusto L. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. *Pesq. agropec. Bras. Brasília*, 2006. Vol. 41, no. 2, pp. 185–194.

4. Noe N., Bonini L. Leaf anatomy of highbush blueberry grown in vitro and during acclimatization to ex vitro conditions. *Biologia Plantarum*. 1996. Vol. 38, no. 1, pp. 19–25.

5. Fabri A. Anatomical changes in persistent leaves of tissue cultured strawberry plants after removal from culture. *Scientia Horticulturae*. 1986, no. 28, pp. 331–337.

6. Gilly C., Rohr R., Chamel A. Ultrastructure and radiolabelling of leaf cuticles from ivy (*Hedera helix* L.) plants in vitro and during ex vitro acclimatization. *Ann. Bot.* 1997. Vol. 80, pp. 139–145.

7. Sutter E. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and sweetgum plants after removal from in vitro culture. *Journal Amer. Soc. hort. sci.* 1998. Vol. 113, pp. 234–238.

8. Polevoy V. V. *Fiziologiya rasteniy* [Plant Physiology]. Moscow, Vyssh. shk. Publ., 1989. 464 p.

9. Campos P. S. Effects of drought on photosynthetic performans and water relations of four Vigna genotypes. *Photosynthetica*. 1999. Vol. 36, no. 1–2, pp. 79–87.

10. Yordanov I., Tsone T., Goltsev V., Kruleva L., Velikova V. Interactive effect of water deficit and high temperature on photosynthesis in sunflower and maize plants. Changes in the parameters of chlorophyll fluorescence induction kinetics and fluorescence quenching. *Photosynthetica*. 1997. Vol. 33, pp. 391–402.

11. Golovko T. K., Tabalenkova G. N. *Fiziologiya rasteniy: sb. opisaniy laboratornykh rabot dlya podgotovki diplomirovannogo spetsialista* [Plant Physiology: A collection of descriptions of laboratory works for the preparation]. Syktyvkar, SLI Publ., 2007. 36 p.

12. Utkin A. I., Ermolova L. S., Utkina I. A. *Ploshchad' poverkhnosti lesnykh rasteniy: sushchnost', parametry, ispol'zovaniye* [The surface area of forest plants: essence, parameters, using]. Moscow, Nauka Publ., 2008. 292 p.

13. Sampson J. A method of replacing dry or moist surfaces for examination by light microscopes. *Nature*. 1961. Vol. 191, pp. 932–933.

14. Wintermans J. F. G. M., De Mots A. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1965. Vol. 109, pp. 448–453.

15. Wettstein D. Formula of chlorophyll determination. *Exp. Cell Res.* 1957. Vol. 12, no. 3, pp. 427–487.
16. Zhuchenko Yu. M. *Statisticheskaya obrabotka informatsii s primeneniyem personal'nykh komp'yuterov* [Statistical processing of information using personal computers]. Gomel', GGU im. F. Skoryny Publ., 2007. 101 p.
17. Lebedev S. I. *Fiziologiya rasteniy* [Plant Physiology]. Moscow, Agropromizdat Publ., 1988. 544 p.
18. Kodun-Ivanova M. A. [Changes in anatomical characteristics of leaves of micropropagated aspen (*Populus tremula*) in acclimation to the *ex vitro* conditions]. *Materialy Mezhdunar. molodezhnoy nauch.-prakt. konf. («Nauchnyye stremeniya – 2012»)* [Materials of the International Youth Scientific and Practical Conference (“Scientific aspirations – 2012”)]. Minsk, 2012, pp. 255–258 (In Russian).

Информация об авторе

Кодун-Иванова Мария Александровна – магистр биологических наук, исследователь в области сельскохозяйственных наук, научный сотрудник лаборатории проблем восстановления, защиты и охраны лесов. Институт леса Национальной академии наук Беларуси (246001, г. Гомель, ул. Пролетарская, 71, Республика Беларусь). E-mail: kodunivanova.les@gmail.com

Information about the author

Kodun-Ivanova Mariya Aleksandrovna – Master of Biology, researcher (Agriculture), researcher fellow, the Laboratory of Problem of restoration, Protection and Conservation of Forest. Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya str., Gomel', 246001, Republic of Belarus). E-mail: kodunivanova.les@gmail.com

Поступила 12.04.2017