

СПОСОБ АДАПТАЦИИ К УСЛОВИЯМ *EX VITRO* ВОДНЫХ РАСТЕНИЙ *HEDYOTIS SALZMANNII* И *ALTERNANTHERA REINECKII* ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ АЭРОПОННОЙ УСТАНОВКИ

Болотина Елизавета Алексеевна – студент 4 курса Института агrobiотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Научный руководитель – Калашникова Елена Анатольевна, д.б.н., профессор, профессор кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Аннотация: разработана технология адаптации микроклонов водных растений *Hedyotis salzmannii* и *Alternanthera reineckii* к условиям *ex vitro* при использовании аэропонной установки и питательного раствора с разными гормонами. Исследовано влияние типа микрочеренков (укоренённые и неукоренённые микропобеги). Адаптацию и развитие культивируемых растений оценивали по таким морфологическим показателям как высота побега и длина корней, индексу роста (*I*) и удельной скорости роста (*μ*).

Ключевые слова: клональное микроразмножение, водные растения, аэропоника, адаптация, *in vitro*, *ex vitro*.

Одним из эффективных способов получения растений, не содержащих патогенов, является клональное микроразмножение. Данный метод предусматривает получение генетически однородного посадочного материала, свободного от вирусов. Технология широко применяется для клонирования ценных лекарственных растений, исчезающих видов или занесенных в Красную книгу РФ, а также плодово-ягодных, древесных лиственных и хвойных пород. В настоящее время интерес к технологии размножения растений *in vitro* постоянно возрастает, и сегодня такую технологию широко применяют для получения высококачественного материала многих аквариумных растений [4. С. 1-2]. Однако при переводе микроклонов из условий *in vitro* в условия *ex vitro* они подвергаются стрессовым воздействиям со стороны внешних условий. Это приводит, как правило, к большой гибели размноженных *in vitro* растений. При адаптации водные растения вынуждены восстановить процесс транспирации для водной среды и перейти от миксотрофного способа питания нижней частью побега, погружённой в питательную среду к миксотрофному питанию всей поверхностью растения. Одним из эффективных способов адаптации растений к условиям *ex vitro* является применение аэропонных установок.

Объектами исследования служили растения *Hedyotis salzmannii* и *Alternanthera reineckii*, размноженные в культуре *in vitro* на безгормональ-

ной питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи MS (Мурасига и Скуга) [2. С. 52-53].

Адаптацию *Hedyotis salzmännii* и *Alternanthera reineckii* на аэропонной установке проводили с использованием микрочеренков двух типов: 1 – микропобеги с корнями (укоренённые микропобеги), 2 – микропобеги без корней (неукоренённые микропобеги).

Полученные микрочеренки культивировали на аэропонной установке, где в качестве питательного субстрата использовали раствор, содержащий ½ нормы минеральных солей по прописи MS в сочетании с различными ауксинами. В работе исследовали влияние ИУК и ИМК в концентрации 0,5 мг/л.

Пропагатор X-Stream 120 – большой аэро-клонер на 120 посадочных мест – позволяет создать идеальные условия для черенкования любых культур и значительно повысить эффективность выращивания (рис. 1).

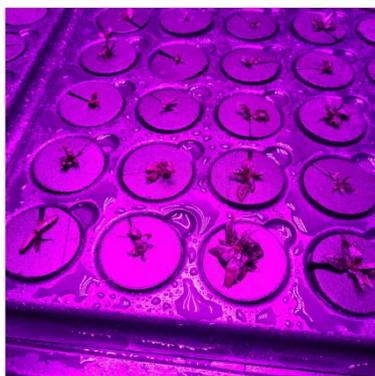


Рис. 1. Микроклоны для *A. reineckii* и *H. salzmännii* в аэропонной установке в момент посадки

Внутри пропагатора можно поддерживать заданные параметры температуры и влажности в обогащенной кислородом среде [5]. В пропагаторе общий объем раствора составлял 40 л. pH во всех вариантах питательного субстрата доводили до 5,6. Освещение осуществлялось светодиодными лампами красного и синего спектра с интенсивностью 300 мкмоль/м²с с круглосуточным освещением. Отметим, что применение светодиодных ламп разного спектрального состава является фактором, оказывающим положительное влияние на адаптацию растений [1. С. 6].

В качестве контроля использовали отстоявшуюся водопроводную воду, которую наливали в стеклянные сосуды и в них помещали микрочеренки *A. reineckii* и *H. salzmännii*. Условия контрольного варианта были выбраны по принадлежности исследуемых растений к водной экосистеме [6. С. 78]. Выращивание проводилось в условиях световой комнаты, где поддерживались температура 22–25 °С, 16-часовой фотопериод, освещение белыми люминесцентными лампами с интенсивностью 3000 лк.

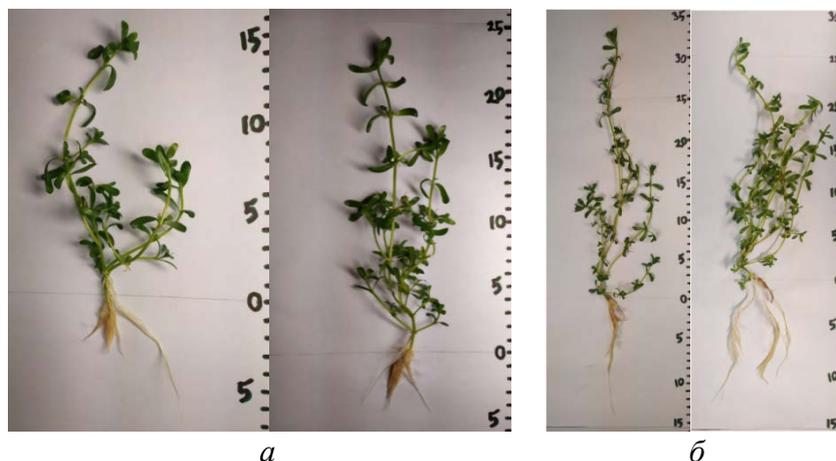
Культивирование растительных объектов каждого варианта проводили в течение 25 дней.

В связи с тем, что на установке не равномерно осуществлялось разбрызгивание раствора, особенно по периферийной части, то в первой серии исследований при использовании ИУК в питательном растворе, нами был отмечен низкий процент приживаемости микропобегов. Так, на 7-е сутки с начала адаптации, доля приживаемости образцов *A. reineckii* составила 62,5 и *H. salzmannii* – 66,7 %. На 25-ые сутки процент жизнеспособных растений *A. reineckii* существенно не отличался и составлял 58,3 %, а у растений *H. salzmannii* этот показатель не изменился.

При проведении исследований с использованием питательного раствора с ИМК подобной технической оплошности допущено не было, поэтому, как и в контрольном варианте, приживаемость растений обоих видов составила 100 %.

Исследования показали, что у исследуемых видов водных растений, не зависимо от используемого типа экспланта (укоренённые и неукоренённые микропобеги) наблюдалось образование корней. Были выявлены некоторые закономерности по образованию и развитию корней. Так, в варианте использования укоренённых микропобегов, имеющиеся корне не развивались, наблюдали образование некрозов на корнях, что приводило к гибели существующих корней. Однако вместо старых корней начинался активный рост новых, молодых корней. Следует отметить, что в контрольном варианте (на водопроводной воде в банках) корни равномерно образовывались и росли по всей длине стебля, за исключением верхнего апекса.

Следует отметить, что существенные различия по вариантам были замечены по росту надземной части растений. Особенно это проявилось у растений *H. salzmannii*. Так, например, при культивировании укоренённых или неукоренённых микропобегов в аэропонной установке, наблюдали активный рост как побегов, так и корней. Учитываемые биометрические показатели были в разы больше, чем в контрольном варианте. Причем, скорость роста корней на неукоренённых побегах была очень высокой, и было отмечено формирование даже корней второго порядка. Растения контрольного варианта значительно отставали как по росту побегов, так и по росту корней (рис. 2).





в

Рис. 2. *H. salzmannii* на 25-е сутки культивирования (слева укоренённые микропобеги, справа неукоренённые микропобеги) а) вариант с ИУК б) вариант с ИМК в) контроль

В контрольном варианте лишь у одного растения образовался зачаток бокового побега, в вариантах с гормонами у всех растений прослеживалось не только образование, но и дальнейшее развитие боковых побегов. В варианте с использованием ИМК растения имели большую биомассу, за счет активации развития пазушных почек, по сравнению с вариантом с применением ИУК.

Что касается растений *A. reineckii*, то рост надземной части и корней был наилучшим при использовании aeropоники, по сравнению с контрольным вариантом (рис. 3).



а

б



в

Рис. 3. *A. reineckii* на 25-е сутки культивирования (слева укоренённые, справа неукоренённые растения) а) вариант с ИУК б) вариант с ИМК в) контроль

Примечательно, что в вариантах с применением ауксинов наблюдали активное образование надземной биомассы как укоренённых, так и неукоренённых в начале культивирования микропобегов.

Чтобы оценить состояние микропобегов в процессе адаптации были определены такие морфометрические параметры, как высота побегов и длина корней растений. Средние значения этих показателей приведены в табл. 1.

Таблица 1

Средние значения длин корней и побегов исследуемых растений на конец культивирования

Вид растения	Условия	Тип черенка	Средние длины, см	
			корней	побегов
<i>H. salzmannii</i>	ИУК	укоренённые	5,6±0,3	13,3±0,5
		неукоренённые	7,9±0,4	22,5±0,8
	ИМК	укоренённые	10,8±0,5	41,5±1,3
		неукоренённые	11,2±0,5	35,3±1,2
<i>H. salzmannii</i>	контроль	укоренённые	4,3±0,3	5,3±0,3
		неукоренённые	4,2±0,3	4,6±0,3
<i>A. reineckii</i>	ИУК	укоренённые	1,5±0,1	1,9±0,1
		неукоренённые	1,6±0,1	1,8±0,1
	ИМК	укоренённые	9,0±0,4	3,6±0,2
		неукоренённые	10,2±0,4	2,9±0,1
	контроль	укоренённые	3,1±0,1	1,7±0,1
		неукоренённые	1,9±0,1	1,7±0,1

Исследования показали, что применение ИУК или ИМК оказало не одинаковое влияние на формирование корневой системы и надземной части побегов. Наилучшие результаты по формированию корневой системы были получены при использовании ИМК. В этом варианте учитываемые показатели были в 2-2,5 раза выше по сравнению с контрольным вариантом для *H. salzmannii* и в 3-4 раза – для *A. reineckii*. Что касается применения ИУК, то средняя длина корней *H. salzmannii* была в 1,5 раз выше контроля, а в варианте с *A. reineckii* средняя длина корней оставалась на уровне контроля. Средняя длина побегов *H. salzmannii* в варианте с использованием ИМК превышала контрольный вариант в среднем в 7-8 раз, а для растений *A. reineckii* этот показатель был больше контроля в 1,5-2 раза. При использовании ИУК средняя длина побегов *H. salzmannii* была в 3-4 раза выше контроля, а в варианте с *A. reineckii* средняя длина побегов оставалась на уровне контроля.

Исходя из полученных данных следует заключить, что при адаптации укоренённых микропобегов и неукоренённых микропобегов *H. salzmannii* и *A. reineckii* наилучшие результаты по адаптации были получены в варианте использования субстрата, в состав которого входила индолмасляная кислота (ИМК).

О характере адаптации микрокультуры к условиям *ex vitro* судили и по таким показателям как: индекс роста (I) и удельная скорость роста (μ). Для определения индекса роста (I) применяли формулу:

$$I = (X_{\max} - X_0)/X_0, \quad (1)$$

где X_{\max} и X_0 – максимальное и начальное значения высоты побегов или длины корней, см.

Для определения удельной скорости роста (μ) применяли формулу:

$$M = (\ln X_2 - \ln X_1)/(t_2 - t_1), \quad (2)$$

где X_2 и X_1 – высота побега/длина корневой системы, см, в моменты времени t_2 и t_1 , сут⁻¹, соответственно [3. С. 352].

Результаты приведены в таблице 2.

Таблица 2

Средние значения ростовых характеристик исследуемых растений

Растение	Условия	Тип черенка	Индекс роста (I)		Удельная скорость роста (μ), сут ⁻¹	
			корней	побегов	корней	побегов
<i>H. salzmannii</i>	ИУК	укоренённые	0,73	3,96	0,019	0,060
		неукоренённые	1,66	6,41	0,052	0,076
	ИМК	укоренённые	1,00	6,92	0,033	0,086
		неукоренённые	4,80	6,45	0,106	0,079
	контроль	укоренённые	1,19	0,30	0,028	0,010
		неукоренённые	2,13	0,35	0,071	0,012
<i>A. reineckii</i>	ИУК	укоренённые	0,53	0,26	0,016	0,009
		неукоренённые	0,53	0,29	0,021	0,009
	ИМК	укоренённые	7,28	0,92	0,059	0,026
		неукоренённые	2,67	0,76	0,068	0,024
	контроль	укоренённые	1,28	0,08	0,044	0,003
		неукоренённые	2,44	0,03	0,059	0,001

Анализируя рассчитанные данные, стоит выделить низкие значения прироста побегов и посуточный их прирост за время культивирования у контрольных вариантов обоих растений. В свою очередь растения *H. salzmannii*, выращенные в аэропонных условиях с гормонами по этим показателям превосходят контроль в несколько раз. Однако по показателям прироста корней нельзя сказать о плюсах гормона ИУК.

По большинству характеристик у обоих видов водных растений наибольшие показатели были в варианте культивирования в аэропонике с гормоном ИМК.

Стоит отметить, что наличие или отсутствие корней у черенков в начале эксперимента значимо не сказалось на ростовых характеристиках взрослых растений.

После 25 дней выращивания *H. salzmännii* и *A. reineckii* в разных условиях адаптации, все растения были перенесены в условия *ex vitro*, а именно в аквариум, в стеклянные банки, объёмом в 1 литр, или пластиковые контейнеры. Обновление воды для всех растений производили один раз в неделю, а чистку сосудов - один раз в две недели.

За 60-дневный период выращивания микроклонов в условиях *ex vitro* у всех растений *H. salzmännii* и *A. reineckii* были отмечены дальнейшие активный рост и формирование хорошей вегетирующей надземной массы.

Таким образом, на основании проведённых исследований целесообразно заключить, что применение аэропонных установок на последнем этапе клонального микроразмножения позволяет получать высококачественный посадочный материал *Hedyotis salzmännii* и *Alternanthera reineckii*, характеризующийся быстрым ростом как корней, так и побегов.

Библиографический список:

1. Гуцин А.В. Оптимизация технологии клонального микроразмножения современных сортов декоративных культур / А.В. Гуцин и др. // Sciences of Europe. – 2019. – №2. – С. 6.
2. Калашникова Е.А. Лабораторный практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. Издание 3 с исправлениями и дополнениями. – М.: Изд.-во РГАУ-МСХА, 2014. – 53 с.
3. Лакин Г.Ф. Биометрия: учеб. пособие для биол. спец. вузов / Г.Ф. Лакин – М.: Высшая школа. – 1990. – 352 с.
4. Немцова Е.В. Клональное микроразмножение некоторых видов аквариумных растений в культуре *in vitro* / Е.В. Немцова и др. // Разнообразие растительного мира. – 2018. – №3. – С. 1-3.
5. Пропагатор X-Stream 120 [Электронный ресурс] // АгроДом URL: <https://agrodom.com/gidropomnye-ustanovki/klonery-paniki-propagatory/nutriculture/propagator-x-stream-120/> (дата обращения: 10.02.2021).
6. Mayorova O.Y., Hrytsak L.R., Drobyk N.M. Adaptation of the obtained *in vitro* *Gentiana lutea* L. plants to *ex vitro* and *in situ* conditions / O.Y. Mayorova, L.R. Hrytsak, N.M. Drobyk // Biotechnologia Acta. – 2015. – Т. 8. – №. 6. – С. 78.

METHOD OF ADAPTATION TO *EX VITRO* CONDITIONS OF AQUATIC PLANTS *HEDYOTIS SALZMANNII* AND *ALTERNANTHERA REINECKII* USING AN AEROPONIC SETUP

Bolotina Elizaveta Alekseevna – 4th-year bachelor student of the Institute of Agrobiotechnology of the Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy. Russian Federation.

Scientific supervisor – **Kalashnikova Elena Anatolyevna**, Doctor of Biological Sciences, Professor, Professor of the Department of Biotechnology Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy. Russian Federation.

Abstract: a technology has been developed for adapting microclones of aquatic plants to *ex vitro* conditions using an aeroponic setup and a nutrient solution with different phytohormones. The influence of the type of micro-cuttings (rooted and non-rooted micro-shoots) is investigated. Adaptation and development of cultivated plants were evaluated by such morphological indicators as shoot height and root length, growth index (I) and specific growth rate (μ).

Keywords: clonal micropropagation, aquatic plants, aeroponics, adaptation, *in vitro*, *ex vitro*.