

МЕТОДЫ АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ К УСЛОВИЯМ *EX VITRO*

Шульгина Алла Андреевна, аспирант кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева, alja.shulgina@yandex.ru

Калашникова Елена Анатольевна, д.б.н., профессор и зав. кафедрой биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева, kalash0407@mail.ru

Чуксин Иван Сергеевич, ассистент кафедры биотехнологии ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА им. К. А. Тимирязева, chuksin@rgau-msha.ru

Аннотация: Наша работа посвящена изучению методов адаптации стерильных растений к условиям *ex vitro* и поиск способов, позволяющих снизить при этом потери растительного материала.

Ключевые слова: *Stevia rebaudiana*, *in vitro*, адаптации к условиям *ex vitro*, аэропоника.

Для ряда исследований в области микрклонального размножения необходим процесс адаптации растений-регенерантов к условиям *ex vitro*. Однако, наибольшие потери растительного материала происходит именно на этапе адаптации. Чтобы сделать возможным промышленное микрклональное размножение, необходимо разработать методику, позволяющую успешно переносить растения из условий *in vitro* в нестерильные условия.

Гибель растений-регенерантов на этапе адаптации в большинстве случаев происходит из-за разрушения мембран при обезвоживании тканей (водный стресс) вследствие быстрого снижения влажности. Другой причиной является заражение инфекцией растений от влажного субстрата.

Способность растений к адаптации к условиям *ex vitro* различается от морфологии самого растения.

Наш научный объект (*Stevia rebaudiana* Bertoni, сем. *Asteraceae*) отличается достаточно низкой жизнеспособностью при адаптации, а потому, является показательным при исследованиях такого рода.

В работе были использованы четыре метода адаптации:

1. Адаптация «классическим способом» (с использованием пластиковых стаканчиков);
2. Адаптация в мини-парнике;
3. Адаптация в аэропонике;
4. Адаптация с использованием физических и химических «изоляторов», являющийся авторской модификацией.

Для адаптации стерильных растений к условиям *ex vitro*, в качестве субстрата использовали нейтрализованный торфяной грунт «Агробалт-С» с полным набором питательных элементов (азота - 150 мг/л, фосфора - 150 мг/л, калия - 250 мг/л, магния – 30 мг/л, кальция - 120 мг/л и микроэлементы).

Перед пересаживанием микрочеренки проходили стадию укоренения с помощью веществ гормональной активности до формирования хорошо развитой корневой системы, и побега, высотой не менее 4 см и имеющего 3-4 междоузлия.

В серии экспериментов по адаптации растений «классическим способом», после пересадки их прикрывали индивидуальными пластиковыми стаканчиками, смоченными изнутри. Периодическое проветривание постепенно понижало влажность, после чего стаканчики убирали. Однако, при такой методике сложно организовать плавное снижение влажности, при проветривании этот параметр снижался скачкообразно. Вся установка требовала к себе постоянное внимание, причём каждое растение приходилось проветривать отдельно. Нужную степень проветривания экспериментатору приходится определять, ориентируясь только на внешние признаки стресса растений (потеря листьями тургора). Растения выдерживали в повышенной влажности некоторое время, что вызывало их заражение от субстрата в более чем 30% случаев. Процент выживаемости при таком способе составлял всего 65%. Для того, чтобы избежать обширного заражения, нужно было использовать другие методы адаптации.

Была поставлена следующая задача: не допустить заражения микрочеренков от субстрата. Первый приём – это стерилизация субстрата – нейтрализованного торфяного грунта «Агробалт-С» с полным набором питательных элементов (азота - 150 мг/л, фосфора - 150 мг/л, калия - 250 мг/л, магния - 30мг/л, кальция - 120 мг/ л и микроэлементы).

Другим приёмом улучшения методики адаптации являлось увеличение объёма камеры для адаптации (со стаканчика 200 мл до контейнера 10 л) чтобы снижение влажности проходило для всех растений одинаково.

При адаптации растений в пластиковом контейнере объёмом 10 л, процент выживаемости был около 74 %, формировались растения правильной морфологии с крупными листьями, до 2-3 см в длину. Бóльший объём ёмкости для адаптации позволял регулировать влажность у всех растений сразу, а не у каждому по отдельности, что делало этот способ адаптации менее трудозатратным, чем с использованием индивидуальных пластиковых стаканчиков. Наши расчёты оказались верны, влажность снижалась более плавно. Хотя и приходилось выдерживать растений в повышенной влажности несколько дней, благодаря стерилизации субстрата растения, процент заражения снизился с 30 до 15.

Следующий способ избегания заражения микрочеренков от субстрата заключалась в исключении из системы адаптации самого субстрата. Аэропоника – бессубстратная технология выращивания, при которой питательные вещества доставляются к корням в виде аэрозоля. В этом случае укоренившиеся микроклоны стевии переносили в условия аэропонной системы, в 70-литровый резервуар (пропагатор) с прозрачной пластиковой крышкой. Подача питательного раствора осуществлялась с помощью 8 вертикально направленных форсунок. В качестве насоса использовали аквариумная помпа для подачи воды мощностью 30 Вт. Растения стевии закрепляя на специальных

держателях – поролоновых дисках. Состав питательного раствора для растений включал в себя линейку комплексные удобрения с микроэлементами: «Flora Gro», «Flora Micro» и «Flora Bloom», pH раствора поддерживали в пределах 5,8–6,2. После помещения в пропатор растения на первое время прикрывали пластиковыми контейнерами. После чего приоткрывали прозрачную пластиковую крышку, постепенно увеличивая угол открытия. Внешний вид растений стевии в аэропонной установке представлен на рис. 1.



Рис. 1. Выращивание растений стевии в аэропонной установке

Однако, аэропонная установка полностью не решала проблему плавного снижения влажности. При закрытой крышке пропатора образовывался обильный конденсат, отверстие в верхней части крышки с ним не справлялось. Устранить его можно было только приоткрыванием крышки, что опять же, не решало проблему.

Чтобы устранить проблему атрофирования устьиц и последующих трудностей с адаптацией глобально, на наш взгляд, нужно избежать выращивания растений при повышенной влажности, начиная уже с этапа *in vitro*. Т. е. готовить их к переходу в новые условия уже на этой стадии.

Если выращивать растение в незакрытой пробирке или если в процессе выращивания её приоткрыть и постепенно понижать влажность, с большой вероятностью произойдёт заражение стерильной питательной среды, представляющей собой отличный субстрат для развития бактерий и грибов. Следовательно, чтобы адаптация прямо в пробирке стала возможной, необходимо изолировать питательную среду – поверх среды поместить некое вещество, обладающее изолирующими свойствами. Для простоты назовём это вещество «изолятором». Подобрать такой «изолятор» и являлось целью нашего следующего эксперимента.

Схема представлена в таблице и включала в себя четыре физических изолятора: глицерин, желатин, парафин и воск, а также четыре химических изолятора: антибиотики «Гентамицин», «Бициллин», «Нистатин» и «Натамицин», а также два контрольных варианта: положительный – открытые

пробирки без покрытия (K+), в который в любом случае ожидалась контаминация, и отрицательный – стерильно закрытые пробирки (K–), чистота который подтверждала бы адекватность полученных результатов.

Таблица

Схема опыта по выявлению эффективных изоляторов для стерильной питательной среды

Вариант	Положит. контроль (K+)	Отрицат. контроль (K–)	Химические «изоляторы» (антибиотики)				Физические «изоляторы»					
			Гентамицин	Бициллин	Нистатин	Натамицин	глицерин	желатин	парафин	воск		
«Изолятор»	открытые пробирки со средой МС, проавтоклавированны	закрытые пробирки со средой МС, проавтоклавированны										

Для выявления и оценки эффективности изоляции стерильной среды, названные выше вещества, были помещены на среду в открытые пробирки, по 10 шт. на каждый вариант. Количество антибиотика брали из расчёта 250 ЕД (единиц действия) на пробирку, а остальные вещества в один слой. Желатин и глицерин распределяли слоем в 8-10 мм поверх среды, парафин и воск – плотным слоем в 5 мм. Температура воздуха в световой комнате составляла 21 °С, а влажность 60 %.

Начиная с 4-го дня наблюдали визуальные проявления контаминации в положительном контроле и варианте с желатиновым покрытием среды. Положительный контроль полностью заразился через 15 дней, а к 20-22 дню полностью потеряли изолирующую способность покрытия «Нистатином», «Гентамицином», «Бициллином», глицерином и желатином. Процесс заражения во времени представлен на рис. 2.

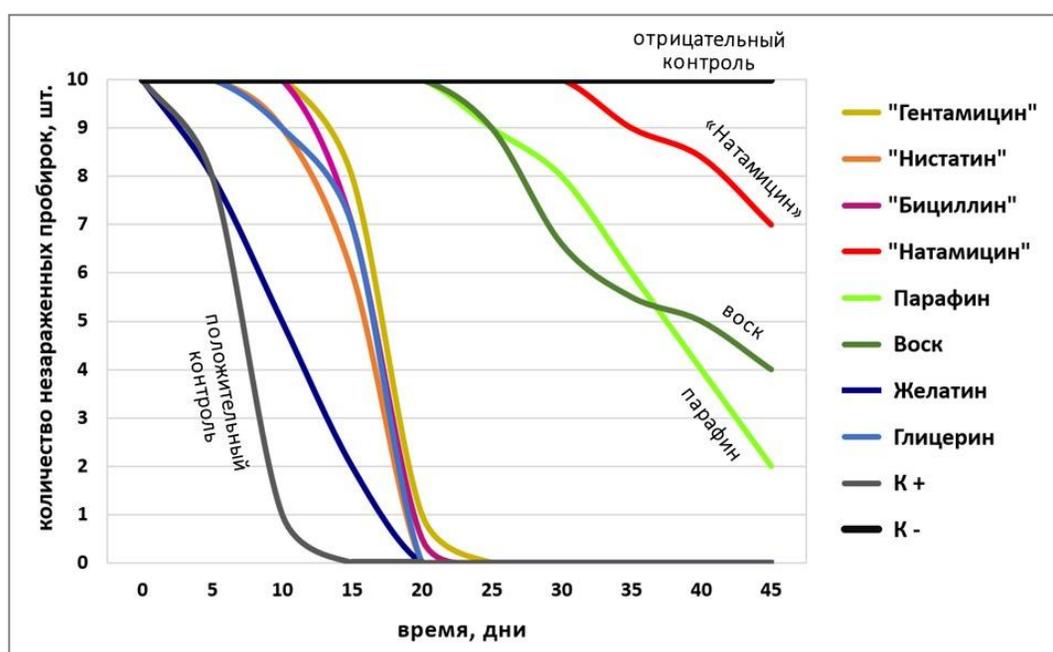


Рис. 2. График заражения пробирок со средой (без растений), покрытых разными «изоляторами»

Из всех вариантов обработки наилучшие результаты были получены в варианте с «Натамицином», в течение месяца не наблюдали образование микроколоний на питательной среде. Возможность выращивания растений с применением этого антибиотика в данных условиях требует дальнейшей проверки.

Что касается «физических изоляторов», то лучшим вариантом из представленных оказались воск и парафин. Глицерин и желатин подверглись стремительной грибной контаминации: на 13 день заразилась пятая часть пробирок с глицерином и больше половины с желатином. К 20 дню незараженных из них не осталось. В пробирках с покрытием из парафина и воска среда стала заражаться только по истечению месяца. В последующий месяц, в половине случаев изоляционный слой ссыхался, вслед за ним среда отставала от внутренних стенок пробирки и в образовавшийся зазор проникало заражение.

В результате эксперименты был сделан вывод, что применение физических и химических «изоляторов» на последнем этапе клонального микроразмножения оказывает положительное влияние на адаптацию растений.

Библиографический список

1. Gopinath P., Irene Vethamoni P., Gomathi M. Aeroponics Soilless Cultivation System for Vegetable Crops. / P. Gopinath, P. Irene Vethamoni, M. Gomathi // Chemical Science Review and Letters, 2017. №6 (22). – P. 838-849.

2. Шульгина А. А., Калашникова Е. А. Влияние веществ гормональной природы на клональное микроразмножение *Stevia rebaudiana* Bertoni *in vitro*. // Труды Кубанского Государственного Аграрного Университета. Материалы IV Международной научно-практической конференции «Инновационные технологии в области генетики, селекции, семеноводства и размножения растений», №3(72), 2018. — С. 382–385.

3. Шишкин П. В. Антипова О. В. Бессубстратная технология гидропонного выращивания. Hydroponics technology to grow plants without soil. // Научно-практический журнал «Овощи России», №3 (36) 2017. – с. 56-61.

УДК 57.083.134:577.17:582.929.4

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ САХАРОЗЫ НА ПОКАЗАТЕЛИ СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР *AGASTACHE MEXICANA* (KUNTH) LINT & EPLING

Поливанова Оксана Борисовна, старший преподаватель кафедры биотехнологии, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева

Башак Амитабх, магистрант кафедры биотехнологии, ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева

Аннотация: В ходе исследования была произведена оценка ростовых показателей суспензионных культур *A. mexicana*, а также динамики