

УДК 635.977.582.736

Адаптація рослин-регенерантів *Prunus serrulata* 'Kansan' та *Cercis siliquastrum* 'Albida' *ex vitro*

Лариса А. Колдар

Національний дендрологічний парк «Софіївка» НАН України, м. Умань, Черкаської обл., Україна, e-mail: koldar55@ukr.net
ORCID ID0000-0002-6756-4172

Реферат.

Мета. Одним із сучасних перспективних методів одержання масового садивного матеріалу є розмноження *in vitro*, коли при мінімальній кількості вихідного матеріалу, у короткі строки, можна отримати велику кількість морфологічно вирівняного та генетично однорідного матеріалу. Це окремий напрямок сучасної біотехнології, який ґрунтується на використанні культури тканин, клітин та органів рослин здатних утворювати морфогенний калус, адвентивні бруньки, пагони та у подальшому формувати цілі рослини. Останнім етапом процесу мікротклонального розмноження рослин є адаптація до умов *ex vitro*. Це досить складний та стресовий етап для рослин-регенерантів, як морфологічно, так і фізіологічно. Під час адаптації рослин до нових для них умов, гине значна кількість регенерантів, тому актуальним є розробка системи адаптації пробіркових рослин *Cercis siliquastrum* 'Albida' та *Prunus serrulata* 'Kansan', яка б сприяла підвищенню кількості адаптованих рослин до умов *ex vitro*. **Матеріали і методи.** Вивчення системи адаптації рослин-регенерантів до умов *ex vitro* проводили досліджуючи залежність стану рослин від складу та кислотності субстрату, вологості ґрунту та повітря, температурного режиму та інтенсивності освітлення. **Результати.** Встановлено оптимальну фазу їхнього розвитку, під час якої вони найбільш пристосовані до перенесення у нестерильні умови. Невід'ємною складовою адаптації *ex vitro* є склад та кислотність субстрату. Дослідженнями доведено, що з усіх представлених субстратів найбільш ефективними виявились Еко plus універсальний, Поліський універсальний та Klassmann Deilman на яких приживання адаптованих рослин становило $63 \pm 2 - 81 \pm 1\%$ за реакції ґрунтового середовища 6,0–6,5. Важливою умовою успішного росту і розвитку рослин є вологість повітря оскільки її нестача в повітрі або надлишок є шкідливими. Використання у дослідженні спеціальних скляних камер сприяло приживанню $76 \pm 2 - 80 \pm 1\%$ рослин. Не менш важливе значення для росту і розвитку рослин має температура ґрунту і повітря від якої залежить інтенсивність фотосинтезу, здатність кореневої системи до засвоєння поживних речовин, дихання рослин, транспірація та інші фізіологічні процеси. У наших дослідженнях рослини-регенеранти тривалий час росли і розвивалися за температури 24 ± 1 °C, 16-годинному фотоперіоді і пристосували всі процеси життєдіяльності саме до таких умов. **Висновки.** Адаптація рослин, з дотриманням всього комплексу умов дорощування (субстрати, кислотність, вологість, температура, освітлення) сприяла підвищенню показників приживання у *C. siliquastrum* 'Albida' до $76 \pm 2\%$, а у *P. serrulata* 'Kansan' до $81 \pm 1\%$.

Ключові слова: розмноження *in vitro*, нестерильні умови, живильні субстрати, кислотність, приживання.

Adaptation of plants-regenerants *Prunus serrulata* 'Kansan' and *Cercis siliquastrum* 'Albida' ex vitro

Larysa A. Koldar

National dendrological park "Sofiyivka" of the National Academy of Sciences of Ukraine, Uman, Cherkasy region, Ukraine,

e-mail: koldar55@ukr.net

ORCID ID0000-0002-6756-4172

Abstract.

Aim. One of the modern promising methods for obtaining mass-produced planting material is *in vitro* propagation. A minimum amount of starting material and in a short time, a large number of morphologically-aligned and genetically homogeneous materials can be obtained. This is a separate direction of modern biotechnology, which is based on the use of a culture of tissues, cells and organs of plants capable to form morphogenic callus, adventitious kidneys, shoots, and subsequently form the whole plant. The final stage in the process of microclone propagation of plants is adaptation to the conditions of *ex vitro*. This is a rather complicated and stressful stage for regenerative plants, both morphologically and physiologically. During the adaptation of plants to new conditions, a significant number of regenerants die, so the development of a system of adaptation of *Cercis* test plants is relevant. **Methods.** Study of the system of adaptation of plants-regenerants to *ex vitro* conditions was carried out by investigating the dependence of the state of plants on the composition and acidity of the substrate, soil moisture and air, temperature regime and intensity of illumination. **Results.** The components of the adaptation of *C. siliquastrum* 'Albida' and *P. serrulata* 'Kansan' plants-regenerants to the *ex vitro* conditions were investigated. An optimal phase of their development is established, during which time they are most adapted to transfer to non-sterile conditions. An integral part of the *ex vitro* adaptation is the composition and acidity of the substrate. It has been proved by researches that from all presented substrates the following Eko Plus Universal, Polissya Universal and Klassmann Deilman were the most effective. The surviving of adapted plants was 63 ± 2 – $81 \pm 1\%$ in the reaction of soil medium (pH) of 6.0–6.5. An important condition for the successful growth and development of plants is the humidity of the air, because its lack or surplus is harmful. Use in the study of special glass chambers contributed to the surviving of 76 ± 2 – $80 \pm 1\%$ of plants. Equally important for the growth and development of plants is the temperature of the soil and the air on which the intensity of photosynthesis depends, the ability of the root system to absorb nutrients, plant respiration, transpiration and other physiological processes. In our studies, regeneration plants have been growing and developing for a long time at temperatures 24 ± 1 °C, a 16-hour photoperiod and adapted all the processes of life exactly to such conditions. **Conclusions.** Adaptation of plants, concerning the whole complex of conditions of cultivation (substrate, acidity, humidity, temperature, lighting), contributed to an increase in the surviving of *C. siliquastrum* 'Albida' to 76 ± 2 , and at the same time *P. serrulata* 'Kansan' to $81 \pm 1\%$.

Key words: *in vitro* propagation, non-sterile conditions, nutritional substrates, acidity.

Вступ/Introduction. Основною біологічною функцією рослинного організму є розмноження, що забезпечує його існування та сприяє розселенню рослин на якомога більші території. Здійснення цих функцій у природних умовах відбувається за рахунок насінного та вегетативного розмноження. Ці ж методи є основними за розмноження рослин в умовах культури. Проте поряд з традиційними, не менш ефективними і перспективними є нові методи розмноження, у галузі сучасної експериментальної біології, зокрема — розмноження *in vitro*, яке є одним з головних у сучасній біотехнології. Суть цього методу полягає у здатності рослинних тканин утворювати на живильних середовищах під впливом рістрегулюючих речовин калус, пагони, корені та формувати цілі рослини (Бутенко, 1999). Крім того, рослинні системи *in vitro* є зручними об'єктами для дослідження процесів клітинної диференціації, морфогенезу (гемогенезу та ризогенезу), морфології розвитку і регенерації рослин, мікророзмноження цінного матеріалу (Мельничук, 2003). Крім цього біотехнологічні методи дають змогу швидко розмножити рослини, збільшити їх коефіцієнт розмноження та отримати масово морфологічно вирівняний садивний матеріал.

Серед великого різноманіття рослин, що населяють нашу планету, провідне місце посідають деревні рослини. Представниками цієї групи є рослини роду *Cercis* L. (за APG IV — родина *Fabaceae* Lindl), які походять

з прадавньої флори Землі та *Prunus* L. (родина *Rosaceae* L.) — рід плодових та декоративних кісточкових рослин поширених, головним чином, у північних помірних областях земної кулі. (Меженський, 2009; APG IV, 2016).

Представники вказаних родів заслуговують особливої уваги, оскільки є цінними джерелами декоративного матеріалу, зокрема їх декоративні форми — *Cercis siliquastrum* 'Albida' та *Prunus serrulata* 'Kansan'. Вони об'єднують рослини з високо-декоративними властивостями: тривалим рясним цвітінням, яскравим забарвленням квіток, оригінальною формою крони, високою загальною декоративністю, зокрема дерева вишні дрібно-пильчастої сорту 'Kansan' вирізняються яскравими рожевими хризантемоподібними квітками дуже варіюють за формою крони і характеризуються рясним цвітінням, завдяки чому вони є перспективними для використання у зеленому будівництві України (Колдар, 2006; Меженський, 2009).

Незважаючи на популярність церцисів та сакур у багатьох країнах світу, в Україні, на жаль, вони достатньо не використовуються і представлені у колекціях ботанічних садів, дендропарків та інколи у вуличних насадженнях міст і приватних колекціях. Однак поповнення рослинних ресурсів залежить не лише від наявності перспективного асортименту, а й потребує ефективних технологій розмноження та вирощування, розроблених для конкретних видів, сортів, форм тощо (Стріла, 2001).

Матеріали і методи/ Materials and Methodology. Досліджували ріст та розвиток рослин-регенерантів *ex vitro*, отриманих методом *in vitro*. Адаптацію рослин проводили у адаптаційній кімнаті лабораторії мікроклонального розмноження Національного дендропарку «Софіївка» НАН України. Використовували живильні субстрати: Кротовинка (виробник СПД «Рябчун» Україна, Есо-plus універсальний і субстрат професійний, виробництва ТОВ «Торф Ленд Україна», Поліський універсальний — виробник Тз ОВ «Річ Ленд» Україна та субстрат за № 4сп. Ft.(K)T9-3 виготовлений на основі білого сфагнового моху і торфу виробництва фірми «Klassmann Deilman GmbH» (Німеччина), різні за вмістом NPK та мікроелементів, кислотністю та консистенцією (табл. 1).

Таблиця 1. Вміст NPK в субстратах
Table 1. NPK content in substrates

Субстрат/Substrate	Вміст мг/л/The content of mg/l		
	N	P	K
Кротовинка/Krotovynka	250	250	350
Есо-plus універсальний/ Eco-plus Universal	140	180	215
Субстрат професійний/ Professional substrate	120	140	180
Поліський універсальний/ Polissya universal	150	200	160
№ 4сп. Ft.(K)T9-3	170	110	220

У процесі роботи рослини-регенеранти виймали з пробірок, корені промивали розчином перманганатом калію ($KMnO_4$) та висаджували на живильні субстрати. Ріст рослин відбувався за температури 23 ± 2 °C, інтенсивності освітлення 3000 люкс та 16-годинному фотоперіоді.

Результати та обговорення/ Results and Discussion. Складним, для рослин-регенерантів, які росли в умовах *in vitro* стресовим етапом, як морфологічно так і фізіологічно є адаптація до умов *ex vitro* (Melnychuk et al., 2003; Koldar, 2009). Варто зазначити, що під час адаптації рослин до нових для них умов відсоток приживання регенерантів є невисоким, тому актуальним є пошук шляхів, які б сприяли підвищенню відсотка адаптованих *ex vitro* рослин. На даній стадії розвитку, при перенесенні рослин-регенерантів у нестерильні умови, вони потребують ретельного догляду і регульованих умов культивування. Тому виникає необхідність створення таких умов адаптації рослин до умов *ex vitro*, за яких можна отримати найвищий відсоток їх приживлення.

Перенесення рослин-регенерантів у нестерильні умови адаптації, потребує значної уваги щодо встановлення оптимальної фази їхнього розвитку під час якої вони найбільш пристосовані до перенесення в умови *ex vitro*. За даними наших спостережень з'ясовано, що не кожна рослина-регенерант, вирощена у пробірці, здатна до

успішної адаптації. Пристосувати свою життєдіяльність та проявити стійкість до дії різних чинників у нових умовах росту здатні рослини які досягли такої фази розвитку коли вони мають добре сформований центральний пагін, або кілька пагонів з однією або кількома парами листків здатних до фотосинтезу, мають добре сформовані центральний та бічні корені і надзвичайно важлива наявність кореневих волосків, які є легко проникними для води і у всисній зоні виконують функції поглинання з ґрунту води і мінеральних речовин, оскільки їхні оболонки щільно прилягають до структури субстрату. Крім цього, вони виділяють в ґрунт речовини, які сприяють перетворенню важкорозчинних з'єднань у доступні для рослин форми і сприяють розвитку мікрофлори (рис. 1. В).

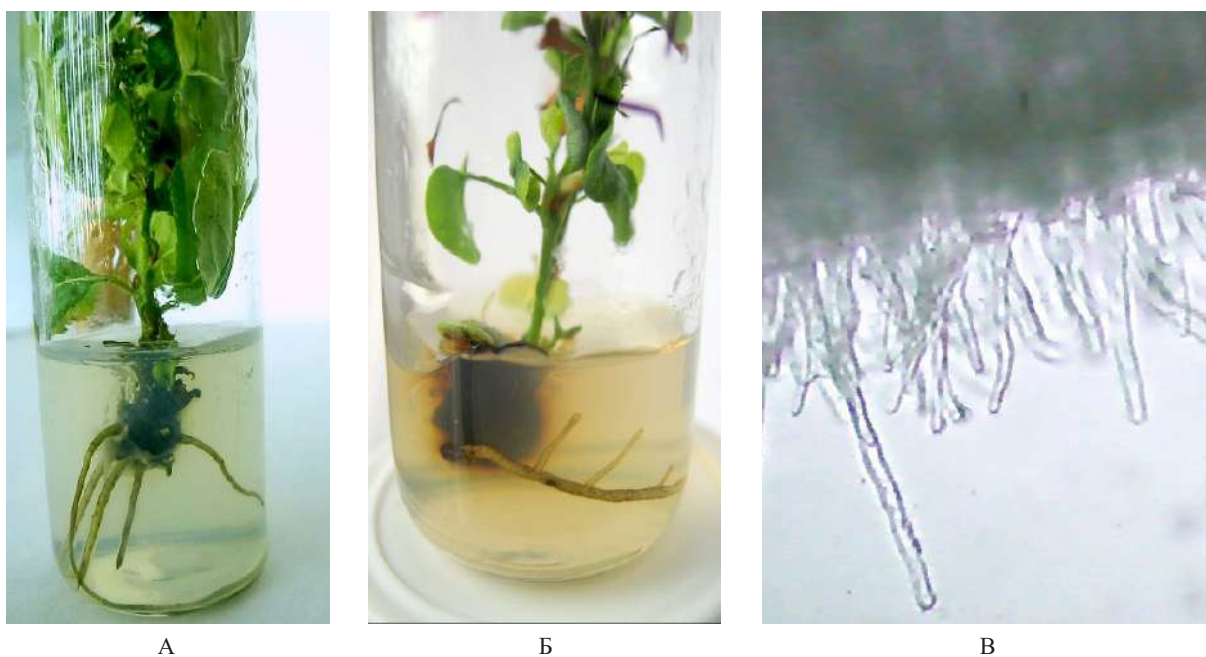


Рисунок 1. Оптимальні фази розвитку рослин-регенерантів для перенесення в умови *ex vitro*
 Figure 1 Optimal phases of development of plants-regenerants for transfer to *ex vitro* conditions

A.— *P. serrulata*

Б.— *C. siliquastrum* 'Kansan'

В.— Кореневі волоски 'Albida'
 Root hairs у *C. siliquastrum* 'Albida' *in vitro*

Не менш важливою складовою адаптації *ex vitro* рослин-регенерантів є живильні субстрати. Варто зазначити, що пробіркові рослини, одержані *in vitro*, отримували із живильних середовищ всі елементи потрібні для їхньої життєдіяльності: макро- та мікроелементи, фітогормони, вуглеводи, вітаміни, амінокислоти тощо. Проте, при перенесенні їх у нестерильні умови, рослини потрапляють в інші умови росту і для забезпечення фізіологічних процесів, які відбуваються у рослині їм необхідне засвоєння низки хімічних елементів і речовин.

У значних кількостях рослинам потрібен азот, фосфор, калій, кальцій, магній, у значно менших — залізо, марганець, цинк, мідь, бор, молібден, які є життєво необхідними елементами для рослин. Тому склад субстрату, наявність у ньому необхідних рослині поживних речовин є важливою складовою адаптації.

З усіх досліджуваних субстратів найбільш ефективними виявились Есо-plus універсальний і субстрат професійний, Поліський універсальний та ґрунтосуміш № 4сп. Ft. (К) Т9-3 на яких приживання адаптованих рослин відповідно становило у *C. siliquastrum* 'Albida' 76 ± 2 ; 65 ± 3 ; 64 ± 2 та $72 \pm 1\%$. УУ *P. serrulata* 'Kansan' найвищий відсоток приживання був на субстраті Поліський універсальний ($81 \pm 1\%$), на Есо-plus універсальний — $65 \pm 1\%$, на № 4сп. Ft. (К) Т9-3 — $63 \pm 2\%$, а на субстраті професійному — $71 \pm 3\%$. Значно менший відсоток приживання (41 ± 2 – $46 \pm 2\%$) одержано за використання субстрату Кротовинка (табл. 2).

Таблиця 2. Приживання рослин-регенерантів залежно від субстрату
 Table 2. Surviving of plants-regenerants depending on the substrate

Таксон Taxon	Приживання рослин-регенерантів, % Surviving of plants-regenerants, %				
	Субстрат/Substrate				
	Есо-plus універсальний/ Есо-plus Universal	субстрат професійний/ Substrate is professional	Поліський універсальний/ Polissyauniversal	№ 4сп. Ft. (К) Т9-3	Кротовинка Krotovynka
<i>Cercis siliquastrum</i> 'Albida'	76±2	65±3	64±2	72±1	41±2
<i>Prunus serrulata</i> 'Kansan'	65±1	71±3	81±1	63±2	46±2

Не менш важливою складовою адаптації рослин-регенерантів є реакція ґрунтового середовища субстрату (рН) від якої залежить засвоєння живильних речовин. Наслідки невідповідності вимог рослини до показника кислотності ґрунту, та його фактичного значення є згубними для неї. Для більшості рослин динаміка показника рН ґрунту, за всіма циклами спостереження, відповідає реакції ґрунту, що близька до нейтральної з рН — 5,6–6,0 (Pysarenko & Chukhlib, 2011). Надмірно високий рН ґрунту (вище 9 та надмірно низький (менше чотирьох) діють на коріння рослин токсично. У межах цих показників рН, визначається поведінка окремих живильних сполук тобто їх осадження чи перетворення у доступні або недоступні для рослин форми. У досліджуваних нами субстратах реакція ґрунтового середовища перебувала в межах 5,6–6,5 і сприяла всім необхідним рослинні живильним сполукам, залишатися у доступній формі а відсоток приживання при цьому у *C. siliquastrum* 'Albida' був у межах 64–76%, а у *P. serrulata* 'Kansan' — 63–81%. На субстраті Кротовинка рН якого становив 6,0–7,0 показники приживання були значно нижчими і становили відповідно 41–46%.

Висока ефективність адаптації постійно потребує підтримання оптимальної відносної вологості ґрунту та повітря. У рослинному організмі вода є найважливішою неорганічною сполукою і безперервно циркулюючи вона бере участь у всіх процесах життєдіяльності, постачає клітинам мінерали та метаболіти, а також одночасно видаляє продукти їх життєдіяльності, зокрема й токсичні речовини (Мусієнко, 2001; Стріла, 2011). Чим більше в клітині води, тим інтенсивніший у ній обмін речовин.

Культуральні рослини, що тривалий час (до 200 діб, інколи і більше) перебували (росли) у пробірках за стабільної вологості живильного середовища та повітря з повністю відкритими продирами, при перенесенні в умови адаптації потрапляють в екстремальні умови і потребують створення таких умов зволоження, за яких зменшується випаровування води, а продиховий апарат пристосовує свою роботу до новостворених умов.

У зв'язку з цим після висадки рослин у контейнери їх рясно поливали. Однак перезволоження ґрунту негативно впливало на рослини-регенеранти і призводило до появи грибкових захворювань, а пізніше і до загибелі значної кількості рослин. Тому контейнери з ґрунтосумішшю, в яку висаджували рослини розміщували у спеціально підготовлені камери. Як показали наші спостереження рослини потребували помірного поливу не частіше як 1 раз у 2–3 доби.

Важливим фактором при адаптації рослин *ex vitro*, є вологість повітря, яку в наших дослідах у перші 3–5 діб, підтримували використовуючи спеціальні скляні камери у яких на перших етапах росту вологість підтримували на рівні 90%, з поступовим зниженням до 70%, надаючи рослинам можливість пристосуватись до умов з меншою вологістю повітря. Після п'яти діб культивування, камери відкривали і надавали рослинам можливість адаптуватись до умов навколишнього середовища. Такий спосіб поступової адаптації забезпечував успішне приживлення рослин.

Для продовження свого росту і розвитку, за умов адаптації *ex vitro*, пробіркові рослини потребують оптимального температурного режиму від якого залежать інтенсивність фотосинтезу, здатність кореневої системи до засвоєння живильних речовин, дихання рослин, транспірації та перебіг інших фізіологічних процесів. У наших дослідженнях культуральні рослини тривалий час росли і розвивалися за температури 24±1 °С, 16-годинному фотоперіоді і пристосували всі процеси життєдіяльності саме до таких умов. Проте при перенесенні їх з умов *in vitro* в умови *ex vitro* вони потрапляли в екстремальні умови росту. Тому для успішної адаптації, висаджених

у контейнери рослин, створювали аналогічний температурний режим на рівні $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Варто зазначити, що коливання температури повітря негативно впливало на приживлення рослин.

Не менш важливим фактором середовища, який визначає біологічні ритми рослин є світло, оскільки з ним пов'язані усі життєві функції рослин. Тому підбір оптимальної інтенсивності освітлення є важливим моментом, при адаптації рослин-регенерантів. Джерелом світла, під час розмноження рослин *in vitro* зазвичай є електричні лампи різних типів, серед яких перше місце займають люмінесцентні.

У наших дослідженнях, для успішної адаптації найбільш оптимальним було використання люмінесцентних ламп з високою світловіддачею і низьким тепловипромінюванням, що дуже важливо для умов закритого приміщення. Культивування досліджуваних нами рослин-регенерантів проводили за інтенсивності освітлення 3000–5000 люкс з фотоперіодом 16 год. Такі рослини відрізнялись активним ростом, формували додаткові пагони та утворювали добре розвинену кореневу систему.

Отже, процес адаптації рослин-регенерантів *P. serrulata* 'Kansan' та *C. siliquastrum* 'Albida' тривав 10–14 діб. За цей період проводили ретельний огляд з видаленням 2–3% відмерлих рослин. Особини, в яких було помітно початок росту, що свідчило про пристосування до нестерильних умов, переносили на стелажі адаптаційної кімнати з регульованими інтенсивністю освітлення та температурою. Вологість повітря зменшували до 70%, проте це не шкодило активному наростанню вегетативної маси та галуженню кореневої системи. Адаптовані до таких умов рослини добре розвивались збільшуючи об'єм. Через 20–25 діб культивування рослини були готові до перенесення у відкритий ґрунт для адаптації *in vivo*.

Висновки/Conclusions. Відбір рослин-регенерантів та адаптація їх до умов *ex vitro* є завершальним етапом розмноження рослин *in vitro*. За дотримання повного комплексу умов необхідних для росту і розвитку рослин: встановлення оптимальної фази розвитку рослин-регенерантів, підбору живильних субстратів з оптимальною кислотністю, вологістю ґрунту та повітря, встановлення відповідної температури та режиму освітлення, відсоток приживання становив у *C. siliquastrum* 'Albida' до $76 \pm 2\%$, а у *P. serrulata* 'Kansan' до $81 \pm 1\%$.

Список посилань/References

APG IV. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: The Angiosperm Phylogeny Group. *Botanical Journal of the Linnean Society*. Vol. 181. № 1. P. 1–20. DOI:10.1111/boj.12385.

Butenko R. H. (1999). *Byolohyia kletok vysshyykh rastenyi in vitro y byotekhnolohyy na ykh osnovе*. Moskva: FBK-PRESS. 60 s. (in Russian).

Koldar L. A. (2006). *Introduktsiia vydiv rodu Cercis L. u Pravoberezhnyy Lisostep Ukrainy ta perspektyvy vykorystannia ikh u zelenomu budivnytstvi*. Uman: UVPP. 158 s. (in Ukrainian).

Koldar L. A. (2009). Features of regenerants' of *Cercis siliquastrum* L. adaptation to *ex vitro* conditions. *Plant Introduction*. № 4. P. 65–67. (in Ukrainian).

Melnychuk M. D., Novak T. V., Kunakh V. A. (2003). *Biotekhnolohiia roslын*. 520 s. (in Ukrainian).

Mezhenskyj V. M., Sychov O. I. (2009). Introduction of a new *Cerasus* species and hybrids in Ukraine. *Plant Introduction*. № 3. P. 18–26. (in Ukrainian).

Musiienko M. M. (2001) *Fiziolohiia roslын*. Kyiv: Fitosotsiotsentr. P. 53–58. (in Ukrainian).

Pysarenko P. V., Chukhlib Yu. O. (2011). Doslidzhennia ahroekolohichnoho stanu hruntiv Poltavs'koi oblasti za rezul'tatamy ikh ekoloho-ahrokhimichnoho obstezhennia. *News of the Poltava State Agrarian Academy*. № 3. P. 12–15. (in Ukrainian).

Strila T. E. (2001). Scientific grounds of microclones adaptation and cranberry growing in protected ground. *Plant Introduction*. № 1–2. P. 139–145. (in Ukrainian).

Received: July, 11

Accepted: July, 27