

DOI

УДК 633.81:57.085.2

АДАПТАЦИЯ К УСЛОВИЯМ *EX VITRO* МИКРОРАСТЕНИЙ *LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* MILL. ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ РАЗМНОЖЕНИИ *IN VITRO*

С. С. Бабанина, Н. А. Егорова, О. В. Якимова, М. С. Коваленко

Реферат. Цель исследования – выявление особенностей адаптации к условиям *ex vitro* растений лаванды после длительного клонального микроразмножения. Эксперименты выполняли на микрорастениях лаванды узколистной (*Lavandula angustifolia* Mill.) сорта Синева, полученных после 8, 11, 12, 14, 15 и 16 субкультивирований, при адаптации *ex vitro*. Количество растений в каждом субкультивировании – $n=10$ шт., повторность 3-х кратная. Микрорастения с хорошо развитыми побегами и корнями высаживали в смесь торфа и перлита (1:1) и выращивали при освещенности 2...3 кЛк, продолжительности фотопериода 16 ч, температуре $24\pm 2^\circ\text{C}$, влажности воздуха 70%. Частота адаптации микрорастений в зависимости от количества субкультивирований варьировала незначительно и составила 83...100%. На 60 сутки адаптации длина побега была достоверно выше на 21...28% у микрорастений после 8 субкультивирований (206,73 мм) по сравнению с 14, 15 и 16 пассажами. По длине дополнительных побегов различий в зависимости от количества субкультивирования не отмечено. По количеству узлов на основном побеге наблюдали тенденцию к их уменьшению с увеличением количества пассажей. Выявлен достоверный рост содержания хлорофилла *a* с увеличением количества субкультивирований на 14 сутки адаптации, однако в дальнейшем эти различия нивелировались. В среднем по пассажам индекс жизнеспособности *in vitro* составил 1,45 и возрастал до 30 суток адаптации до 1,75. Выявленные особенности изменения морфометрических и физиологических параметров свидетельствуют о хорошей адаптационной способности анализируемых растений, при этом микроразмножение *in vitro* на протяжении 16 субкультивирований существенно не снижало их адаптационный потенциал. Оптимальным сроком адаптации *ex vitro* является период 45...60 суток, в течение которого растения формировали хорошо развитые побеги (3,20...6,00 г) и корневую систему (0,619...1,143 г).

Ключевые слова: лаванда (*Lavandula angustifolia* Mill.), клональное микроразмножение, адаптация *ex vitro*, индекс жизнеспособности, коэффициент фотосинтетической активности, хлорофилл.

Введение. Эфирные масла лаванды узколистной (*Lavandula angustifolia* Mill.) применяют в производстве мыла, парфюмерии, пищевых ароматизаторов и других продуктов, а также в медицине, как противомикробные агенты [1]. Ее широко используют как декоративное и медоносное растение.

Для производства саженцев лаванды зачастую используют метод зеленого черенкования [2]. Наряду с традиционными методами размножения этой культуры активно разрабатывают приемы клонального микроразмножения разных видов рода *Lavandula* [3, 4, 5]. Однако преимущественно все эти работы посвящены оптимизации состава питательных сред для разных этапов размножения *in vitro*, а вопросы адаптации затронуты в единичных публикациях [6, 7]. Основной проблемой широкого распространения технологии культуры тканей считают высокую себестоимость продукции. Разработанный протокол клонального микроразмножения для получения микрорастений должен включать экономически обоснованные условия для проведения всех этапов размножения *in vitro* [8]. Трудности, возникающие во время закаливания и акклиматизации, считают одними из основных проблем, неблагоприятно влияющими на масштабирование технологий размножения *in vitro* [9].

Вопросы клонального микроразмножения, касающиеся адаптации *ex vitro* растений после длительного субкультивирования, изучены весьма фрагментарно. Однако это важный вопрос, так как от способности размноженных микрорастений сохранять свой

регенерационный потенциал зависит эффективность всей методики микроразмножения *in vitro* [10, 11].

Для *L. angustifolia* ранее была показана относительная стабильность коэффициента размножения вплоть до 9-го пассажа, с увеличением его в 3...4 субкультивирования [12]. В работах Н. А. Егоровой с соавторами не отмечено снижения ризогенной способности лаванды узколистной по мере культивирования, при этом в течение 12 пассажей частота укоренения варьировала незначительно [13]. В нашей предыдущей работе [14] оценены микрорастения лаванды сорта Синева в процессе адаптации, полученные после 4...8-ми субкультивирований.

Достоверных различий между пассажами по массе микрорастений, параметрам фотосинтетической активности не установлено и показана возможность успешной адаптации *ex vitro* микрорастений.

Также при оценке генетической стабильности трех сортов лаванды узколистной при длительном (до 16 субкультивирований) клональном микроразмножении с использованием RAPD и ISSR маркеров не установлено какого-либо полиморфизма между растениями одного сорта [15].

Настоящее исследование представляет интерес не только для анализа эффективности длительного микроразмножения растений лаванды при получении качественного посадочного материала, но и для возможного поддержания коллекций *in vitro* в обычных условиях культивирования при 26°C .

Цель исследований – выявление особенностей адаптации к условиям *ex vitro* растений лаванды после длительного клонального микроразмножения.

Условия, материалы и методы. Эксперименты выполняли на микрорастениях лаванды узколистной (*Lavandula angustifolia* Mill.) сорта Синева, полученных после 8, 11, 12, 14, 15 и 16 субкультивирований, в процессе их адаптации *ex vitro*.

Микроразмножение in vitro.

Для соблюдения условий асептики с первого по третий этапы микроразмножения *in vitro* все работы выполняли в условиях бокса БАВнп-01-«Ламинар-С»-1,2 (Россия). Основные этапы клонального микроразмножения (введение в культуру, собственно микроразмножение, укоренение *in vitro*) осуществляли с использованием ранее разработанных модификаций питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) [5]. При введении в культуру *in vitro* пазушные меристемы с двумя листовыми примордиями помещали на среду МС, содержащую 1,0 мг/л кинетина (Кин.) и 0,5 мг/л гибберелловой кислоты (ГК₃) («Sigma», США).

На этапе собственно микроразмножения в качестве эксплантов использовали сегменты стебля с одним узлом, полученные при микрочеренковании побегов, которые культивировали 35...40 суток на среде МС с 0,5 мг/л Кин. и 0,1 мг/л ГК₃. Для укоренения микрочеренки с 1 узлом культивировали 45 суток на среде ½МС с добавлением 0,5 мг/л индолилмасляной кислоты (ИМК).

Микрорастения с хорошо развитыми побегами и 3...6 корнями извлекали из питательной среды и после промывания корней помещали в пластиковые стаканы объемом 200 мл с автоклавируемым субстратом, состоящим из 50% торфа с нейтральной рН и 50% перлита.

Высаженные микрорастения накрывали прозрачными стаканами, для обеспечения высокой влажности (90...95%) в течение первых 7...10 суток, а затем постепенно

открывали для акклиматизации к условиям культуральной комнаты с влажностью воздуха 70%, освещенностью 2...3 кЛк, продолжительностью фотопериода 16 ч, температурой 24±2°C.

Микрорастения по мере подсыхания субстрата поливали раствором Кнопа. При адаптации учеты и наблюдения осуществляли на 14, 30, 45 и 60 сутки после переноса в условия *ex vitro*. Количество растений в каждом субкультивировании – n=10 шт., повторность 3-х кратная.

Физиологические исследования.

Оценку хлорофилла (a, b и общего количества) и содержания каротиноидов выполняли на пяти случайным образом отобранных микрорастениях на 14, 30, 45 и 60 сутки после высадки в субстрат. Оценку содержания пигментов фотосинтеза выполняли методом спектрофотометрии на приборе Экрос ПЕ-5300ви из спиртовой вытяжки [16].

Оценку функционального состояния растений лаванды выполняли на приборе LPT-1FCU (Россия). Учитывали индекс жизнеспособности (Fm/F_T) и коэффициент фотосинтетической активности (Kf_n) [17].

На 30, 45 и 60 сутки выращивания учитывали массу корневой системы и надземной вегетативной части растений (n=5 растений).

Статистический анализ.

Достоверность различий оценивали тестом Дункана на 5 %-ном уровне значимости, применяли корреляционный анализ, оценивали размах дисперсии и квартилей распределения признаков. Данные в таблицах представлены в виде среднего и стандартной ошибки, на графиках – доверительные интервалы.

Результаты и обсуждение. Как показано в нашей предыдущей работе, после 8-ми субкультивирований при микроразмножении происходит стабилизация морфометрических показателей, по сравнению с более ранними субкультивированиями [14]. Частота адаптации микрорастений, полученных после 4...16 субкультивирований составляла 83...100 % (рис. 1).

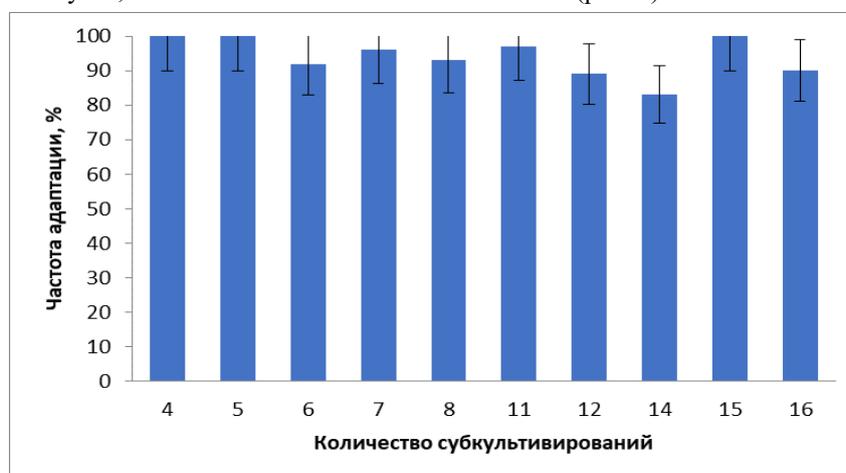


Рис. 1 – Влияние количества субкультивирований на частоту адаптации микрорастений лаванды к условиям *ex vitro*

Согласно результатам двухфакторного дисперсионного анализа на рост и развитие микрорастений лаванды влияли как длительность адаптации (фактор А) и количество субкультивирований (фактор В), так и взаимодействие этих двух факторов (А×В).

Как и предполагалось доля влияния длительности адаптации была больше – 76...90%, при достоверном влиянии количества субкультивирований – 4...9%, и взаимодействия факторов А и В – 4...15% (табл. 1).

Таблица 1 – Результаты дисперсионного анализа влияния длительности адаптации и количества субкультивирования *in vitro* на морфологические показатели микрорастений при адаптации *ex vitro*

Источник варьирования	SS	Степени	MS	F	p
Количество дополнительных побегов					
Длительность адаптации	3548,06*	3	1182,69*	202,67*	0,000*
Количество субкультивирований	234,02*	5	46,80*	8,02*	0,000*
Длительность адаптации×количество субкультивирований	156,09*	15	10,41*	1,78*	0,035*
Длина основного побега					
Длительность адаптации	983039,54*	3	327679,85*	230,90*	0,000*
Количество субкультивирований	54461,88*	5	10892,38*	7,68*	0,000*
Длительность адаптации×количество субкультивирований	86173,23*	15	5744,88*	4,05*	0,000*
Количество узлов на основном побеге					
Длительность адаптации	10039,63*	3	3346,54*	221,55*	0,000*
Количество субкультивирований	418,18*	5	83,64*	5,54*	0,000*
Длительность адаптации×количество субкультивирований	1151,44*	15	76,76*	5,08*	0,000*
Количество узлов на дополнительном побеге					
Длительность адаптации	1534,99*	2	767,49*	171,99*	0,000*
Количество субкультивирований	178,71*	5	35,74*	8,01*	0,000*
Длительность адаптации×количество субкультивирований	308,45*	10	30,85*	6,91*	0,000*

*достоверно на уровне значимости $p \leq 0,05$.

Количество основных побегов не зависело от количества субкультивирований и длительности адаптации и составляло 1–2 шт. Отмечали тенденцию уменьшения количества дополнительных побегов с увеличением количества субкультивирований, однако она не нашла статистического подтверждения. До 45 суток адаптации достоверных отличий между количествами субкультивирований по длине побега не отмечали и на 14 сутки она составляла от 44,24 мм в 12 пассаже до 63,46 мм в 8 пассаже, на 30 сутки – от 91,07 мм до 125,15 мм в тех же пассажах.

По величине этого показателя на 45 сутки адаптации микрорастения, полученные после 8 и 11 субкультивирований, были выше на 10...34%, чем после 12...16 субкультивирований. На 60 сутки адаптации по величине этого показателя лучшими так же оказались микрорастения после 8 субкультивирований (206,73 мм), что выше, чем после 14, 15 и 16 пассажей на 21...28%.

По длине дополнительных побегов закономерностей в зависимости от количества субкультивирования не отмечено. По количеству узлов на основном побеге отмечали тенденцию к их уменьшению с увеличением количества пассажей. Длина побегов в зависимости

от количества субкультивирований увеличилась относительно 14 суток адаптации на 30 сутки в 1,9...2,0 раза, на 45 сутки – в 2,3...2,6 раза, 60 сутки – 2,6...4,2 раза (табл. 2, рис. 2).

В ходе адаптации микрорастений к условиям *ex vitro* происходило накопление вегетативной массы и развитие коревой системы (см. рис.1, рис.2).

У микрорастений, полученных после 8 субкультивирований с 30 по 45 сутки адаптации масса побегов увеличилась в 2,7 раза – это наибольший прирост среди всех пассажей за указанный период. Однако на 60 сутки максимальная в опыте средняя масса микрорастения оказалась после 11 (6,00 г) и 15 субкультивирования (5,78 г), превысив другие пассажи на 24,8...39,6 % (рис. 2а).

Схожую тенденцию отмечали и по развитию корневой системы (рис. 2б). Самый активный прирост и вегетативной массы, и корневой системы происходил после 45 суток адаптации *ex vitro*, когда уже закончен этап адаптации к новым условиям (см. рис. 3а, 3б).

За 60 суток акклиматизации растения характеризовались хорошо развитой надземной частью (3,20...6,00 г) и корневой системой (0,619...1,143 г).

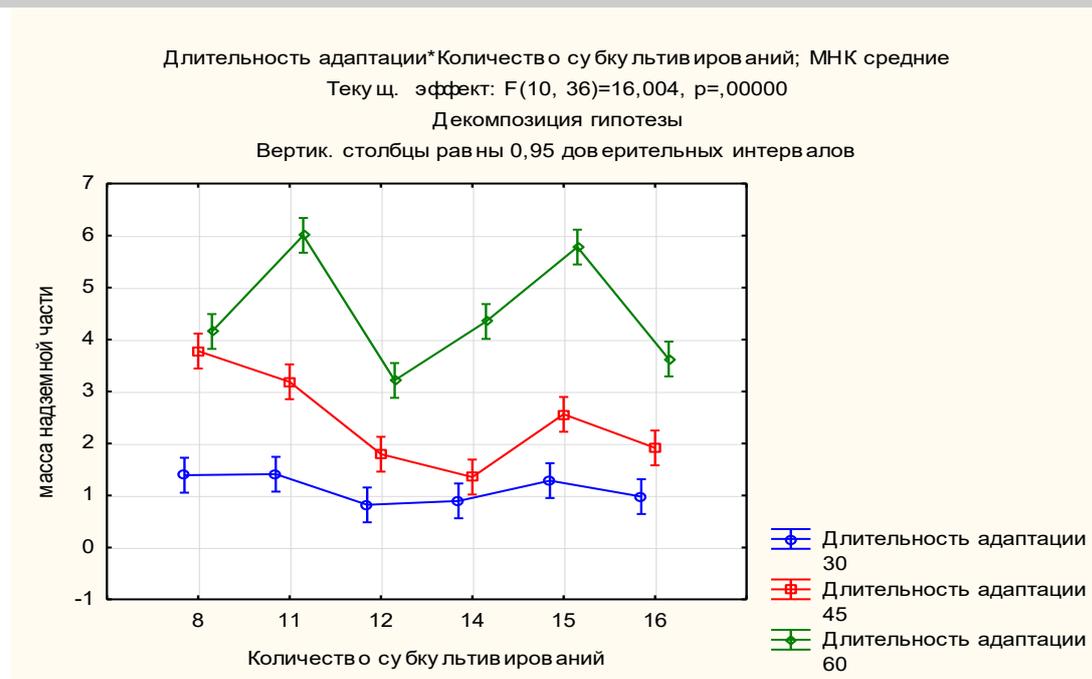
Таблица 2 – Влияние длительности субкультивирования и адаптации *ex vitro* на морфометрические показатели микрорастений лаванды

Количество субкультивируемых	Количество побегов, шт.		Длина побега, мм		Количество узлов, шт./побег	
	основных	Дополнительных	основного	дополнительного	основном побеге	дополнительном побеге
14 суток адаптации						
8	1,25±0,08 ^a	0±0 ^a	63,46±4,28 ^{abc}	0±0 ^a	8,97±0,52 ^{abcde}	0±0 ^a
11	1,14±0,08 ^a	0±0 ^a	59,13±3,25 ^{abc}	0±0 ^a	7,97±0,46 ^{abc}	0±0 ^a
12	1,32±0,13 ^a	0±0 ^a	44,24±3,79 ^a	0±0 ^a	6,70±0,52 ^{ab}	0±0 ^a
14	1,16±0,07 ^a	0±0 ^a	57,72±4,43 ^{abc}	0±0 ^a	7,14±0,54 ^{abc}	0±0 ^a
15	1,19±0,08 ^a	0±0 ^a	54,69±3,38 ^{ab}	0±0 ^a	7,13±0,40 ^{ab}	0±0 ^a
16	1,33±0,11 ^a	0±0 ^a	47,17±4,05 ^a	0±0 ^a	5,89±0,41 ^a	0±0 ^a
30 суток адаптации						
8	1,21±0,08 ^a	6,09±0,62 ^{bcdefgh}	125,15±7,37 ^{bcd}	37,01±1,42 ^b	12,81±0,70 ^{abcd}	4,28±0,10 ^b
11	1,15±0,09 ^a	5,27±0,65 ^{bcdefgh}	120,26±5,63 ^{efg}	33,94±1,33 ^b	12,67±0,60 ^{fghi}	4,77±0,15 ^{bcde}
12	1,27±0,10 ^a	2,56±0,71 ^{abc}	91,07±6,16 ^{bcd}	26,26±2,10 ^{bc}	10,46±0,67 ^{bcdef}	4,22±0,24 ^{bcdef}
14	1,09±0,06 ^a	4,67±0,84 ^{bcdef}	109,08±9,96 ^{def}	29,65±1,46 ^b	12,08±1,06 ^{defgh}	3,97±0,15 ^{bc}
15	1,19±0,09 ^a	5,17±0,84 ^{bcdefg}	105,04±6,87 ^{def}	30,89±1,28 ^b	12,25±0,79 ^{defghi}	4,39±0,17 ^{bce}
16	1,28±0,09 ^a	3,53±0,55 ^{bd}	91,09±5,92 ^{cde}	39,30±2,47 ^{bcde}	10,75±0,52 ^{cdefh}	5,07±0,22 ^{bcdef}
45 суток адаптации						
8	1,19±0,08 ^a	6,89±0,80 ^c	161,25±9,99 ^{hi}	52,35±1,83 ^{ef}	17,15±1,02 ^j	6,71±0,16 ^{hi}
11	1,12±0,08 ^a	6,24±0,67 ^{bcdefgh}	153,28±7,12 ^{ghi}	45,41±1,80 ^{cde}	16,24±0,64 ^{ij}	6,45±0,19 ^{gh}
12	1,21±0,10 ^a	3,50±0,69 ^{abcde}	129,41±7,54 ^{fghi}	35,37±2,90 ^{bcd}	14,91±0,83 ^{ghij}	5,71±0,36 ^{defgh}
14	1,11±0,07 ^a	6,69±1,06 ^{bcdefgh}	137,76±11,37 ^{fgh}	41,06±2,09 ^{bcd}	16,00±1,27 ^{gij}	5,56±0,19 ^{fgh}
15	1,17±0,08 ^a	6,59±0,67 ^{cefgh}	126,11±8,00 ^{efgh}	40,80±1,57 ^{bcd}	14,79±0,67 ^{gij}	5,76±0,16 ^{fgh}
16	1,41±0,11 ^a	5,27±0,72 ^{bcdefgh}	107,19±8,15 ^{def}	48,59±3,12 ^{de}	12,39±0,75 ^{efgh}	6,18±0,31 ^{fgh}
60 суток адаптации						
8	1,10±0,10 ^a	9,10±0,74 ^h	206,73±13,68 ⁱ	62,59±2,49 ^{fg}	23,36±1,50 ^k	7,28±0,26 ^{hij}
11	1,10±0,10 ^a	8,70±1,05 ^g	182,00±9,09 ^{hi}	64,39±2,53 ^g	19,27±0,73 ^{jk}	7,16±0,25 ^{hij}
12	1,00±0,00 ^a	6,80±0,33 ^d	186,20±8,18 ^{hi}	40,76±2,35 ^{bcd}	20,60±0,86 ^{jk}	5,24±0,25 ^{cdefg}
14	1,20±0,13 ^a	8,67±0,84 ^{fgh}	149,17±7,41 ^{fg}	73,81±2,91 ^g	16,00±0,92 ^{fghij}	8,00±0,36 ^{ij}
15	1,40±0,16 ^a	6,80±0,65 ^{defgh}	151,43±13,38 ^{fg}	64,94±2,09 ^g	18,86±1,44 ^{jk}	7,29±0,24 ^{hij}
16	1,40±0,16 ^a	5,80±0,53 ^{bcdefgh}	162,57±14,21 ^g	66,21±4,05 ^g	18,43±1,57 ^{jk}	8,46±0,46 ^j

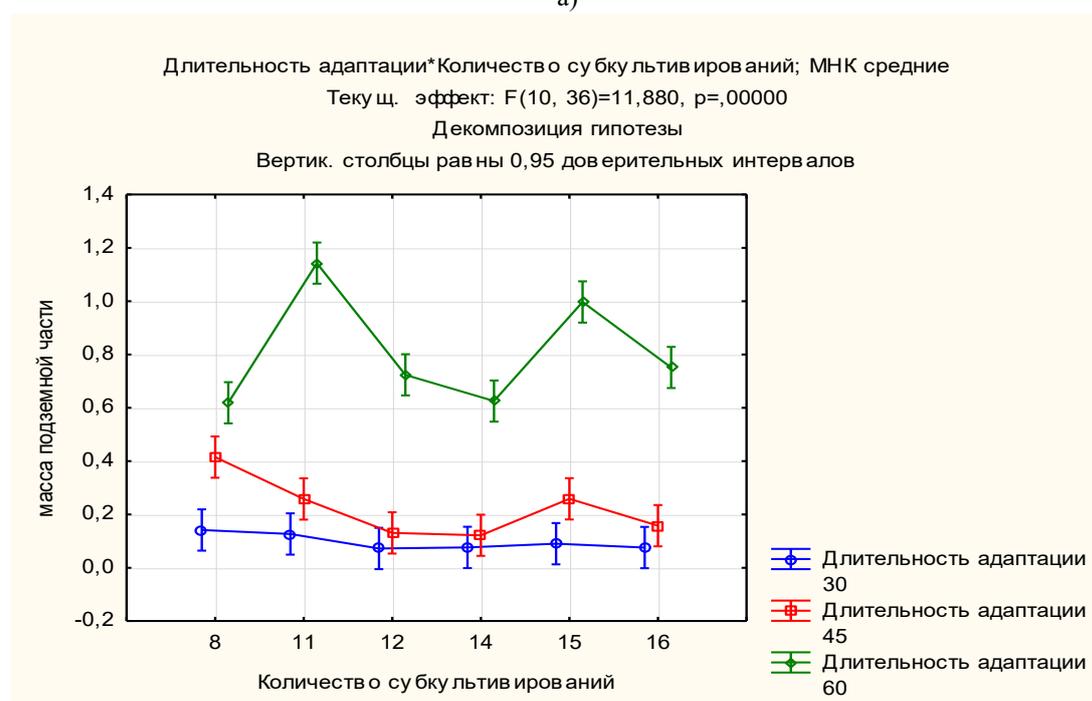
*здесь и в таблицах 2, 3, 4 согласно тесту Дункана значения с одинаковой буквой различаются несущественно при 5 %-ном уровне значимости.



Рис. 2 – Развитие растений лаванды в зависимости от длительности адаптации *ex vitro*: а) 30 суток; б) 45 суток; в) 60 суток).



а)



б)

Рис. 3 – Влияние длительности адаптации *ex vitro* и количества субкультивирований на массу микрорастений лаванды а) надземной части, б) корневой системы

Известно, что в ходе адаптации микрорастений происходит модификация фотосинтетического аппарата. У растений *Decalepis hamiltonii* Wight and Arn. установлено линейное увеличение хлорофилла *a*, *b*, и каротиноидов после извлечения из культуральных пробирок и акклиматизации со снижением их концентрации в первую неделю акклиматизации [18]. В нашем исследовании также отмечали линейное увеличение хлорофилла *a* – с $4,58 \text{ мг/г} \times 10^{-1}$ на 14 сутки

адаптации *ex vitro* до $5,74 \text{ мг/г} \times 10^{-1}$ на 60 сутки, каротиноидов – с $2,80$ до $3,33 \text{ мг/г} \times 10^{-1}$. Содержание хлорофилла *b* тоже возрастало – с $2,70 \text{ мг/г} \times 10^{-1}$ на 14 сутки до $3,25$ и $3,29 \text{ мг/г} \times 10^{-1}$ на 60 и 45 сутки, соответственно. В среднем по пассажам больше всего на длительность культивирования реагировал хлорофилл *a* и каротиноиды. На 60 сутки, по сравнению с первым учетом, количество хлорофилла *a* увеличилось на 25%, *b* – на 20%, каротиноидов – на 19% (рис. 4).

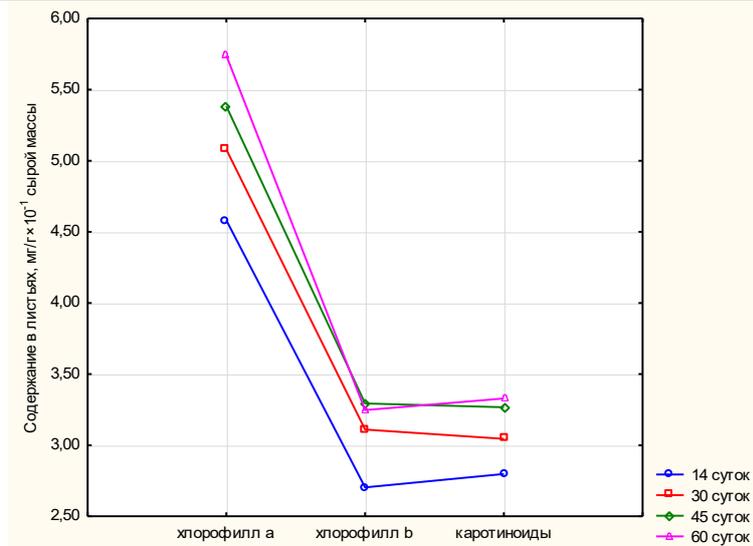


Рис. 4 – Влияние длительности адаптации *ex vitro* на содержание фотосинтетических пигментов (в среднем по всем субкультивированиям)

По passages также наблюдали некоторые изменения в содержании фотосинтетических пигментов в листьях микрорастений лаванды (табл.3). Так, отмечен достоверный рост содержания хлорофилла а с увеличением количества субкультивирований на 14 сутки адаптации – с $3,99 \text{ мг/г} \times 10^{-1}$ сырой массы в 8 субкультивировании до $5,17 \text{ мг/г} \times 10^{-1}$ в 16-ом. В дальнейшем эти изменения нивелировались.

При оценке функционального состояния микрорастений в ходе акклиматизации к условиям *ex vitro* учитывали два основных параметра – индекс жизнеспособности (F_m/F_T) и коэффициент фотосинтетической активности (K_f_n). Динамика изменений этих двух параметров практически идентичны друг другу – коэффициент корреляции составил $r=0,97$ ($p<0,05$).

Таблица 3 – Влияние длительности адаптации *ex vitro* и количества субкультивирований на содержание фотосинтетических пигментов в листьях микрорастений лаванды, $\text{мг/г} \times 10^{-1}$ сырой массы

Количество субкультивирований	Хлорофилл а	Хлорофилл b	Каротиноиды
14 суток			
8	3,99 ^a	2,40 ^b	2,46 ^a
11	4,65 ^c	2,75 ^c	2,82 ^b
12	4,89 ^e	2,98 ^d	3,05 ^c
14	4,58 ^c	2,77 ^c	2,81 ^b
15	4,21 ^b	2,38 ^b	2,55 ^a
16	5,17 ^g	2,94 ^d	3,10 ^c
30 суток			
8	4,96 ^f	3,04 ^d	2,95 ^c
11	4,76 ^d	2,81 ^c	2,80 ^b
12	4,96 ^f	3,10 ^d	2,95 ^c
14	5,68 ^k	3,51 ^f	3,35 ^e
15	4,64 ^c	2,82 ^c	2,85 ^{bc}
16	5,48 ⁱ	3,38 ^e	3,37 ^e
45 суток			
8	5,41 ^h	3,23 ^e	3,22 ^d
11	5,12 ^g	3,09 ^d	3,09 ^c
12	4,57 ^c	2,70 ^c	2,81 ^b
14	5,74 ^l	3,52 ^f	3,48 ^e
15	5,60 ^j	3,71 ^f	3,48 ^e
16	5,86 ^m	3,51 ^f	3,52 ^e
60 суток			
8	6,43 ^c	4,07 ^g	3,95 ^f
11	5,89 ^m	3,30 ^e	3,41 ^e
12	5,51 ⁱ	3,61 ^f	3,37 ^e
14	6,14 ⁿ	2,23 ^a	3,56 ^e
15	4,61 ^c	2,76 ^c	2,80 ^b
16	5,86 ^m	3,51 ^d	2,88 ^{bc}

В предыдущих наших исследованиях на микрорастениях лаванды корреляция составляла $r=0,60$ ($p<0,05$) [14]. В другой работе отмечено, что на стадии размножения лаванды *in vitro* с увеличением количества субкультивирований (с 1 по 4) происходило увеличение индекса жизнеспособности и уменьшение коэффициента фотосинтетической активности [6].

В среднем по пассажам индекс

жизнеспособности *in vitro* составил 1,45 и возрастал до 30 суток адаптации до 1,75. На 45 и 60 сутки величина этого показателя снижалась до 1,51 и 1,38 соответственно. В среднем по срокам учета лучшим оказался 8 пассаж – Fm/F_T составил 1,66. Далее по пассажам отмечали его плавное снижение, которое достигло величины 1,47 в 16 пассаже (табл. 4).

Те же закономерности отмечены и для коэффициента фотосинтетической активности.

Таблица 4 – Влияние количества субкультивирований при клональном микроразмножении и длительности адаптации *ex vitro* на функциональное состояние микрорастений лаванды

Показатель функционального состояния растения	Количество субкультивирований					
	8	11	12	14	15	16
<i>in vitro</i>						
Fm/F _T	1,48±0,03	1,48±0,03	1,41±0,03	1,44±0,03	1,41±0,04	1,50±0,03
Kf _n	0,331±0,011	0,332±0,015	0,313±0,013	0,318±0,016	0,293±0,017	0,347±0,013
14 суток адаптации						
Fm/F _T	1,67±0,05	1,57±0,05	1,70±0,05	1,38±0,04	1,39±0,04	1,39±0,03
Kf _n	0,403±0,013	0,378±0,016	0,412±0,019	0,295±0,019	0,289±0,018	0,298±0,015
30 суток						
Fm/F _T	1,95±0,03	1,66±0,05	1,78±0,06	1,67±0,05	1,69±0,09	1,76±0,06
Kf _n	0,473±0,008	0,389±0,017	0,426±0,017	0,386±0,020	0,379±0,016	0,415±0,017
45 суток						
Fm/F _T	1,61±0,03	1,58±0,05	1,57±0,035	1,46±0,05	1,37±0,03	1,49±0,04
Kf _n	0,396±0,010	0,379±0,016	0,369±0,013	0,324±0,021	0,292±0,015	0,329±0,018
60 суток						
Fm/F _T	1,61±0,04	1,51±0,03	1,41±0,03	1,30±0,02	1,25±0,03	1,22±0,01
Kf _n	0,366±0,012	0,334±0,010	0,286±0,015	0,236±0,011	0,207±0,017	0,195±0,009

Во всех пассажах наибольшие величины Fm/F_T и Kf_n были на 30-е сутки адаптации и варьировали в пределах 1,66...1,95 и 0,386...0,473. На 45-е и 60-е сутки происходило некоторое уменьшение этих показателей. Наибольшее снижение наблюдали для растений 14, 15 и 16 пассажей.

Выводы. Таким образом, в ходе длительного микроразмножения (8...16 субкультивирований) получены микрорастения, которые хорошо акклиматизировались к условиям *ex vitro* с частотой адаптации 83...100%.

На 60 сутки адаптации самой высокой длиной побега характеризовались микрорастения после 8 субкультивирований (206,73 мм), что выше, чем после 14, 15 и 16 пассажей на 21...28%. По длине дополнительных побегов закономерностей в зависимости от количества субкультивирования не отмечено. По количеству узлов на основном побеге наблюдали тенденцию к их уменьшению с увеличением количества пассажей. С 30 по 45 сутки адаптации наибольшее увеличение массы побегов (в 2,7 раза) выявлено у микрорастений, полученных после 8 субкультивирований. На 60 сутки максимальная в опыте средняя масса микрорастения отмечена после 11 и 15

субкультивирований, превысив другие пассажи на 24,8...39,6%. На 14 сутки адаптации *ex vitro* отмечали достоверный рост содержания хлорофилла а с увеличением количества субкультивирований, в дальнейшем эти различия нивелировались. В среднем по пассажирам индекс жизнеспособности *in vitro* составил 1,45 и возрастал до 30 суток адаптации до 1,75. По срокам учета лучшим оказался 8 пассаж – Fm/F_T составил 1,66.

Сопоставление всех анализируемых морфометрических и физиологических параметров свидетельствует о хорошей адаптационной способности *ex vitro* микрорастений лаванды после длительного размножения на протяжении почти двух лет и возможности их успешного микроразмножения, как минимум, в течение 16 субкультивирований. Оптимальный срок адаптации *ex vitro* составил 45...60 суток, в течение которого растения формировали хорошо развитую надземную часть (до 6,00 г) и корневую систему (до 1,143 г).

Сведения об источнике финансирования. Работа выполнена по государственному заданию № FNZW-2022-0008 (регистрационный № 122101300035-2) при финансовой поддержке Минобрнауки РФ.

Литература

1. Goncalves S., Romano A. In vitro culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites // *Biotechnology Advances*. 2013. No. 31. (2013) P. 166–174. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.09.006.
2. Экономически обоснованный способ получения саженцев лаванды сорта Синева / О. Б. Скипор, С. С. Бабанина, А. А. Попова и др. // *Таврический вестник аграрной науки*. 2018. № 2 (14). С. 103–109.
3. *In vitro* Propagation and Volatile Compound Characterization of *Lavandula stoechas* L. subsp. *stoechas* – An Economically Important Source of Essential Oil / S. Mokhtarzadeh, B. Demirci, H. G. Agalar, et al. // *Rec. Nat. Prod.* 2019. Vol. 13. No. 2. P. 121–128.
4. Micropropagation of lavender: A protocol for production of plantlets / J. Koefender, C. E. Manfio, J. N. Camera, et al. // *Horticultura Brasileira*. 2021. No. 39. P. 404–410. doi: 10.1590/s0102-0536-20210409.
5. Егорова Н. А. Биотехнология эфиромасличных растений: создание новых форм и микроразмножение in vitro. Симферополь: Автограф, 2021. 315 с. doi: 10.33952/2542-0720-2021-978-5-6045452-9-4.
6. Adaptiveness of promising lavender and lavandin cultivars under *in vitro* culture and *ex situ* / I. V. Mitrofanova, A. E. Paliy, O. A. Grebennikova, et al. // *Agricultural Biology*. 2018. Vol. 53. No. 3. P. 539–546.
7. *Ex vitro* morphological and anatomical features of lavender and lavandin microplants / O. V. Mitrofanova, V. A. Brailko, I. V. Zhdanova, et al. // *Acta Hort.* 2020. Vol. 1285. P. 23–30. doi: 10.17660/ActaHortic.2020.1285.4.
8. Rapid and efficient protocol for clonal propagation of phenolic-rich *Lavandula multifida* / M. Zuzarte, A. M. Dinis, L. Salgueiro, et al. // *J. of Agricultural Science*. 2015. Vol. 7. No. 3. P. 8–17. doi: 10.5539/jas.v7n3p8.
9. Purohit S. D., Teixeira da Silva J. A., Habibi N. Current approaches for cheaper and better micropropagation technologies // *International Journal of Plant Developmental Biology*. 2011. Vol. 5. No. 1. 36 p. URL: [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOOnline/images/2011/IJPDB_5\(1\)/IJPDB_5\(1\)1-36o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOOnline/images/2011/IJPDB_5(1)/IJPDB_5(1)1-36o.pdf) (дата обращения: 01.03.2023).
10. Cardoso J. C., Gerald L. T. S., Teixeira da Silva J. A. Micropropagation in the Twenty-First Century. In: *Plant cell culture protocols (4th edition)* / Eds.: V.M. Loyola-Vargas, N. Ochoa-Alejo. New York, NY: Humana Press, 2018. P. 17–46.
11. Калашникова Е.А. Клеточная инженерия растений. М.: Юрайт, 2020. 333 с.
12. Morphogenetic, physiological, and biochemical features of *Lavandula angustifolia* at long-term micropropagation in vitro / N. A. Yegorova, I. V. Mitrofanova, V. A. Brailko, et al. // *Russian Journal of Plant Physiology*. 2019. Vol. 66. No. 2. P. 326–334. doi: 10.1134/S1021443719010060.
13. Особенности укоренения *in vitro* и адаптации *ex vitro* сортов и образцов лаванды и душицы / Егорова Н. А., Якимова О. В., Бабанина С. С. и др. // *Эмбриология, генетика и биотехнология: материалы VI Международной Школы-конференции для молодых ученых*. Симферополь: Издательство: Общество с ограниченной ответственностью «Издательство Типография «Ариал», 2022. С. 58–59.
14. Влияние длительности клонального микроразмножения на адаптацию *ex vitro* микрорастений *Lavandula angustifolia* Mill. / С. С. Бабанина, Н. А. Егорова, И. В. Ставцева и др. // *Достижения науки и техники АПК*. 2022. Т. 36. №7. С. 36–42. doi: 10.53859/02352451_2022_36_7_36.
15. Генетическая стабильность растений лаванды узколистной (*Lavandula angustifolia* Mill.) при длительном клональном микроразмножении / С. С. Бабанина, Н. А. Егорова, И. В. Ставцева и др. // *Российская сельскохозяйственная наука*. 2023. № 1. С. 13–19. doi: 10.31857/S2500262723010039.
16. Патент 2244916 С1 Российская Федерация, МПК G01N 21/25, C09B 61/00. Способ определения хлорофилла в растениях гречихи / Лобков В. Т., Наполова Г. В.; патентообладатель Орловский государственный университет; заявл. 02.07.2003; опубл. 20.01.2005, Бюл. № 2. 4 с.
17. Патент RU 2688464 С1 Российская Федерация, МПК A01G 7/04. Способ неразрушающей диагностики функционального состояния растений *ex vitro* и *in vitro* / Будаговская О. Н., Будаговский А. В.; Патентообладатель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Федеральный научный центр имени И.В. Мичурина; заяв. 2018109830, 20.03.2018; опубл. 21.05.2019. 7 с. Бюл. № 15–17 с.
18. In vitro propagation and the acclimatization effect on the synthesis of 2-hydroxy-4-methoxy benzaldehyde in *Decalepis hamiltonii* Wight and Arn. / S. Sharma, A. Shahzad, A. Ahmad, et al. // *Acta Physiol Plant*. 2014. Vol. 36. P. 2331–2344. doi: 10.1007/s11738-014-1606-9.

Сведения об авторах:

Бабанина Светлана Сергеевна – кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии, e-mail: svetlana.babanina@bk.ru
 Егорова Наталья Алексеевна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующая лабораторией биотехнологии, e-mail: yegorova.na@mail.ru
 Якимова Ольга Валерьевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биотехнологии, e-mail: olyuyakimova@yandex.ru
 Коваленко Мария Сергеевна – младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии, e-mail: mary-eko-1@yandex.ru
 Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма, г. Симферополь, Россия.

ADAPTATION TO EX VITRO CONDITIONS OF MICROPLANTS *LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* MILL. AT LONG-TERM REPRODUCTION IN VITRO

S. S. Babanina, N. A. Egorova, O. V. Yakimova, M. S. Kovalenko

Abstract. The purpose of the study is to identify the features of adaptation to *ex vitro* conditions of lavender plants after long-term clonal micropropagation. The experiments were carried out on microplants of narrow-leaved lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.), cv. The number of plants in each subcultivation - n=10 pcs., 3-fold repetition. Microplants with well-developed shoots and roots were planted in a mixture of peat and perlite (1:1) and grown at illumination of 2–3 klx, photoperiod duration of 16 h, temperature of 24 ± 2°C, air humidity of 70%. The frequency of adaptation of microplants, depending on the number of subcultivations, varied slightly and amounted to 83...100%. On the 60th day of adaptation, the length of the shoot was significantly higher by 21...28% in microplants after 8 subcultivations (206.73 mm) compared with 14, 15 and 16 passages. There were no differences in the length of additional shoots depending on the

amount of subculturing. According to the number of nodes on the main shoot, a tendency to their decrease with an increase in the number of passages was observed. A significant increase in the content of chlorophyll a with an increase in the number of subcultivations on the 14th day of adaptation was revealed, however, later these differences leveled out. On average, the *in vitro* viability index for passages was 1.45 and increased up to 30 days of adaptation to 1.75. The revealed features of changes in morphometric and physiological parameters indicate a good adaptive ability of the analyzed plants, while micropropagation *in vitro* during 16 subcultivations did not significantly reduce their adaptive potential. The optimal period of *ex vitro* adaptation is the period of 45...60 days, during which the plants formed well-developed shoots (3.20...6.00 g) and root system (0.619...1.143 g).

Key words: lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.), clonal micropropagation, *ex vitro* adaptation, viability index, photosynthetic activity coefficient, chlorophyll.

References

1. Goncalves S, Romano A. *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula spp.*) and the production of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 2013; 31. 166-174 p. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.09.006.
2. Skipor OB, Babanina SS, Popova AA. [Economically sound method for obtaining lavender seedlings of the Sineva variety]. *Tavrisheskiy vestnik agrarnoy nauki*. 2018; 2 (14). 103-109 p.
3. Mokhtarzadeh S, Demirci B, Agalar HG. *In vitro* propagation and volatile compound characterization of *Lavandula stoechas* L. subsp. *stoechas* – an economically important source of essential oil. *Rec. Nat. Prod.* 2019; Vol.13. 2. 121-128 p.
4. Koefender J, Manfio CE, Camera JN. Micropropagation of lavender: a protocol for production of plantlets. *Horticultura Brasileira*. 2021; 39. 404-410 p. doi: 10.1590/s0102-0536-20210409.
5. Egorova NA. *Biotehnologiya efiromaslichnykh rastenii: sozdanie novykh form i mikrorazmnozhenie in vitro*. [Biotechnology of essential oil plants: creation of new forms and *in vitro* micropropagation]. Simferopol': Avtograf. 2021; 315 p. doi: 10.33952/2542-0720-2021-978-5-6045452-9-4.
6. Mitrofanova IV, Pali AE, Grebennikova OA. Adaptiveness of promising lavender and lavandin cultivars under *in vitro* culture and *ex situ*. *Agricultural Biology*. 2018; 53. 3. 539-546 p.
7. Mitrofanova OV, Brailko VA, Zhdanova IV. *Ex vitro* morphological and anatomical features of lavender and lavandin microplants. *Acta Hort.* 2020; Vol.1285. 23-30 p. doi: 10.17660/ActaHortic.2020.1285.4.
8. Zuzarte M, Dinis AM, Salgueiro L. Rapid and efficient protocol for clonal propagation of phenolic-rich *Lavandula multifida*. *J. of Agricultural Science*. 2015; Vol.7. 3. 8-17 p. doi: 10.5539/jas.v7n3p8.
9. Purohit SD, Teixeira da Silva JA, Habibi N. Current approaches for cheaper and better micropropagation technologies. [Internet]. *International Journal of Plant Developmental Biology*. 2011; Vol.5. 1. 36 p. [cited 2023, March 01], Available from: [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOOnline/images/2011/IJPDB_5\(1\)/IJPDB_5\(1\)1-360.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOOnline/images/2011/IJPDB_5(1)/IJPDB_5(1)1-360.pdf).
10. Cardoso JC, Gerald LTS, Teixeira da Silva JA. Micropropagation in the twenty-first century. In: *Plant cell culture protocols* (4th edition). Eds.: V.M. Loyola-Vargas, N. Ochoa-Alejo. New York, NY: Humana Press. 2018; 17-46 p.
11. Kalashnikova EA. *Klotochnaya inzheneriya rastenii*. [Plant cell engineering]. Moscow: Yurait. 2020; 333 p.
12. Egorova NA, Mitrofanova IV, Brailko VA. Morphogenetic, physiological, and biochemical features of *Lavandula angustifolia* at long-term micropropagation *in vitro*. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2019; Vol.66. 2. 326-334 p. doi: 10.1134/S1021443719010060.
13. Egorova NA, Yakimova OV, Babanina SS. [Peculiarities of *in vitro* rooting and *ex vitro* adaptation of varieties and samples of lavender and oregano]. *Embriologiya, genetika i biotehnologiya: materialy VI Mezhdunarodnoi Shkoly-konferentsii dlya molodykh uchenykh*. Simferopol': Izdatel'stvo: Obshchestvo s ogranichennoi otvetstvennost'yu "Izdatel'stvo Tipografiya "Arial". 2022; 58-59 p.
14. Babanina SS, Egorova NA, Stavtseva IV. [Influence of duration of clonal micropropagation on *ex vitro* adaptation of microplants *Lavandula angustifolia* Mill.]. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*. 2022; Vol.36. 7. 36-42 p. doi: 10.53859/02352451_2022_36_7_36.
15. Babanina SS, Egorova NA, Stavtseva IV. [Genetic stability of narrow-leaved lavender plants (*Lavandula angustifolia* Mill.) during long-term clonal micropropagation]. *Rossiiskaya sel'skokhozyaistvennaya nauka*. 2023; 1. 13-19 p. doi: 10.31857/S2500262723010039.
16. Lobkov VT, Napolova GV. [Method for determining chlorophyll in buckwheat plants]. Patent 2244916 S1 Rossiiskaya Federatsiya, MPK G01N 21/25, C09V 61/00. Patentobladatel' Orlovskii gosudarstvennyi universitet; zayavl. 02.07.2003; opubl. 20.01.2005, Byul. № 2. 4 p.
17. Budagovskaya ON, Budagovskiy AV. [The method of non-destructive diagnostics of the functional state of plants *ex vitro* and *in vitro*]. Patent RU 2688464 C1 Rossiiskaya Federatsiya, MPK A01G 7/04. Patentobladatel' Federal'nyi nauchnyi tsentr imeni I.V.Michurina; zayav. 2018109830, 20.03.2018; opubl. 21.05.2019. 7 p. Byul. № 15-17 p.
18. Sharma S, Shahzad A, Ahmad A. *In vitro* propagation and the acclimatization effect on the synthesis of 2-hydroxy-4-methoxy benzaldehyde in *Decalepis hamiltonii* Wight and Arn. *Acta Physiol Plant*. 2014; 36. 2331-2344 p. doi: 10.1007/s11738-014-1606-9.

Authors:

Babanina Svetlana Sergeevna – Ph.D. of Agricultural Sciences, Senior Researcher, Biotechnology Laboratory, e-mail: svetlana.babanina@bk.ru
 Egorova Natalya Alekseevna – Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher, Head of Biotechnology Laboratory, e-mail: yegorova.na@mail.ru
 Yakimova Olga Valerievna – Ph.D. of Biological Sciences, Researcher, Biotechnology Laboratory, e-mail: olyyakimova@yandex.ru
 Kovalenko Mariya Sergeevna – Junior Researcher, Biotechnology Laboratory, e-mail: mary-exo-l@yandex.ru
 Research Institute of Agriculture of the Crimea, Simferopol, Russia.