

<sup>1</sup>Каленчук Т. В., <sup>1</sup>Пась П. В., <sup>1</sup>Камельчук Я. С., <sup>2</sup>Козлова О. Н.

<sup>1</sup>Беларусь, г. Пинск,

УО "Полесский государственный университет";

<sup>2</sup>Беларусь, г. Минск, ГНУ

"Центральный ботанический сад" НАН Беларуси

## **МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫХ РАСТЕНИЙ РОДА RODODENDRON**

*The results of investigation on the selection of plant material sterilization conditions at the initiation of in vitro cultures Rhododendron × hybridum hort. evergreen varieties Azurro, Marianne von Weizsäcker, Scintillation and deciduous varieties Cannon's Double, Orchid Lights. The optimum ratio konsenratsy growth regulators when obtaining a genetically homogeneous matter Rhododendron × hybridum hort. is 3 mg / l 2iP: 0.6 mg / l IAA.*

Активно используемые в последние десятилетия биотехнологические методы размножения растений обеспечивают ускоренное получение новых ценных сортов, форм и линий сельскохозяйственных и цветочно-декоративных культур. Использование метода микроклонального размножения позволяет получать растения, идентичные исходному типу, в результате которого клонируется генетически однородный, оздоровленный посадочный материал. В большинстве стран этот метод приобрел коммерческий характер и поставлен на промышленную основу. Воспроизведение посадочного материала круглый год позволяет значительно экономить площади, занимаемые маточниками [1].

Род *Rhododendron* - крупнейший по числу видов в семействе вересковых и распространен в подавляющем большинстве в Северном полушарии, от арктических широт до тропиков [2]. Большинство представителей данного рода - это вечнозеленые, полувечнозеленые или листопадные кустарники, кустарнички, реже деревья. Рододендроны в настоящий момент широко применяются в озеленении и фитодизайне, многие виды являются продуцентами различных биологически активных соединений, используемых в фармацевтике и косметической промышленности.

Эффективная технология микроклонального размножения рододендронов может обеспечить необходимое количество здорового, свободного от патогенов растительного материала.

В качестве объекта исследования использовали асептическую культуру побегов *Rhododendron x hybridum* сортов Azurro, Cannon's Double, Marianne von Weizsäcker, Orchid Lights, Scintillation из коллекции растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Для культивирования эксплантов использовали среду WPM с добавлением 5 мг/л 2иП и 1мг/л ИУК (основная среда) [3]. Режим культивирования: температура  $25 \pm 2$  °С, освещенность 3 000 лк, фотопериод 16 часов.

Исходным растительным материалом служили сегменты молодых побегов с верхушечными и пазушными почками. Перед началом стерилизации весь растительный материал тщательно отмывали с хозяйственным мылом. В экспериментах использовали две схемы стерилизации растительного материала для каждого из сортов:

Схема 1:

1. 30 минут замачивание в 10%-м растворе гипохлорида кальция (стерилизующий раствор),
2. Трехкратная отмывка стерильной дистиллированной водой.

Схема 2:

1. 1 час замачивание в 0,4%-м растворе фунгицида (Ридомил-Голд),
2. 30 минут замачивание в 10%-м растворе гипохлорида кальция (стерилизующий раствор),
3. Трехкратная отмывка стерильной дистиллированной водой.

Одно-двух узловые черенки высаживали на среду WPM, с добавлением регуляторов роста 2иП : ИУК в следующем соотношении: 5 мг/л 2иП и 1 мг/л ИУК, 3 мг/л 2иП и 0,6мг/л ИУК, 1 мг/л 2иП и 0,2 мг/л ИУК. В каждую колбу высаживали по 25-30 эксплантов. Эксперимент проводили в трехкратной повторности. Длительность субкультивирования составила 10 недель.

В результате экспериментов установлено, что наибольший выход стерильного растительного материала получен при проведении двухступенчатой стерилизации по схеме 2. Предварительная обработка фунгицидом позволила снизить уровень грибной инфекции до 40%. Однако, следует отметить, в целом достаточно высокий процент некротизированных побегов при использовании предварительной обработки фунгицидом.

Бактериальная инфекция не оказывала значительного отрицательного воздействия на развитие новых побегов из пазушных

почек экплантов. В дальнейшем новые побеги, полученные на средах с бактериальной инфекцией, пересаживали на питательную среду с добавлением антибиотика (цефотаксима) в концентрации 500 мг/л. Это позволило избавиться от бактериальной контаминации и получить асептическую культуру побегов ряда сортов (таблица 1).

Таблица 1 - Влияние способа стерилизации растительного материала на развитие грибной и бактериальной инфекции, а так же некроза экплантов растений рододендрона при введении в культуру *in vitro*

Схема стерилизации	Грибная инфекция, %	Бактериальная инфекция, %	Некрозэкспланта, %
1	60	30	30
2	40	20	40

Таким образом, в результате проведенных экспериментов установлено, что оптимальной схемой стерилизации при введении в культуру сортовых рододендронов с помощью пазушных почек побегов является схема 2 с предварительной обработкой фунгицидом и использованием в качестве стерилизующего агента 10%-ного гипохлорида кальция.

На 2-м этапе полученные *in vitro* стерильные побеги пересаживали на свежие среды с добавлением регуляторов роста для дальнейшего культивирования (рисунок 1).



а) высадка изолированных черенков      б) черенки на среде с цефотаксимом

*Рис. 1 - Инициация асептических культур рододендрона*

При разработке оптимальной методики микроклонального размножения *Rhododendron* L. следует учитывать ряд факторов, в первую очередь коэффициент размножения и длину побега.

С целью оптимизации условий микроклонального размножения ряда сортов *Rhododendron* × *hybridum* hort. нами были протестированы три варианта сочетания регуляторов роста 2иП : ИУК. После десяти недель культивирования на всех вариантах сред наблюдали рост и развитие побегов.

При использовании 2иП: ИУК для вечнозеленых рододендронов (Azurro, Scintillation, Marianne von Weizsäcker) в соотношении 5: 1 наблюдали наибольшее разрастание каллусной ткани в основании побега, а так же образование из нее адвентивных побегов. На длину побега и коэффициент размножения исследованные соотношения достоверно не влияли, хотя наблюдалась тенденция к снижению значений этих показателей при уменьшении концентрации регуляторов роста до 1 : 0,2 (рисунок 2, таблица 2).

Увеличение размера каллусной ткани у основания побегов и вследствие этого развитие адвентивных побегов — это нежелательные последствия при размножении сортового материала, так как увеличивается генетическая неоднородность полученного материала. В связи с этим наиболее оптимальным при микроклональном размножении вечнозеленых рододендронов является соотношение 3 мг/л 2иП : 0,6 мг/л ИУК.

Таблица 2 - Влияние регуляторов роста на развитие побегов вечнозеленых *Rhododendron* в культуре *in vitro*

Сорт	Соотношение 2иП:ИУК, мг/л	Количество побегов на эксплант, шт	Коэффициент размножения	Длина побега, мм	Каллус, %	Адвентивные побеги, %
Azurro	5:1	1,68 ± 0,15	7,97 ± 0,41	25,32 ± 0,56	+	+
	3:0,6	1,39 ± 0,13	7,99 ± 0,44	23,63 ± 1,53	+	-
	1:0,2	1,25 ± 0,14	7,45 ± 0,43	21,84 ± 1,62	-	-
Scintillation	5:1	1,94 ± 0,20	7,91 ± 0,48	27,15 ± 0,89	+	-
	3:0,6	1,74 ± 0,14	7,84 ± 0,41	25,36 ± 1,45	+	-
	1:0,2	1,12 ± 0,15	7,54 ± 0,44	20,63 ± 1,48	-	-
Marianne von Weizsäcker	5:1	1,85 ± 0,25	8,42 ± 0,53	21,84 ± 1,62	+	+
	3:0,6	1,05 ± 0,33	8,93 ± 0,48	23,46 ± 1,79	-	-
	1:0,2	1,10 ± 0,14	6,88 ± 0,41	23,56 ± 0,55	-	-



а)

б)

в)

*Рис. 2 - Проллиферация побегов Rhododendron × hybridum hort. сорта Marianne von Weizsäcker при разном соотношении регуляторов роста (а – 5 мг/л 2иП:1 мг/л ИУК; б – 3 мг/л 2иП:0,6 мг/л ИУК; в – 1 мг/л 2иП:0,2 мг/л ИУК)*

У листопадных рододендронов (сорта Orchid Lights и Cannon's Double) при использовании самой высокой концентрации регуляторов роста также наблюдали наибольшее разрастание каллусной ткани и образование многочисленных адвентивных побегов. Но были ниже показатели длины побега (12,63 и 10,32 мм, соответственно) и коэффициента размножения ( $5,94 \pm 0,44$  и  $6,67 \pm 0,41$  мм, соответственно). Эти показатели достоверно отличались от таковых при использовании более низких концентраций регуляторов роста. Снижение концентрации регуляторов роста до 3:0,6 положительно влияло на показатели длины побегов (сорта Orchid Lights —  $22,84 \pm 1,71$ ; Cannon's Double —  $24,35 \pm 1,13$  мм) и на коэффициент размножения (сорта Orchid Lights —  $9,43 \pm 0,53$ ; Cannon's Double -  $8,99 \pm 0,44$ ) (таблица 3).

Таблица 3 - Влияние регуляторов роста на развитие побегов листопадных *Rhododendron* в культуре *in vitro*

Сорт	Соотношение 2иП:ИУК, мг/л	Количество побегов на экплант, шт	Коэффициент размножения	Длина побега, мм	Каллус, %	Адвентивные побеги, %
Orchid Lights	5:1	6,05 ± 0,33	5,94 ± 0,44	12,63 ± 0,63	+	+
	3:0,6	1,85 ± 0,21	9,43 ± 0,53	22,84 ± 1,71	-	-
	1:0,2	1,12 ± 0,33	7,89 ± 0,48	23,15 ± 2,02	-	-
Cannon's Double	5:1	5,04 ± 0,24	6,67 ± 0,41	10,32 ± 0,48	+	+
	3:0,6	1,89 ± 0,15	8,99 ± 0,44	24,35 ± 1,13	-	-
	1:0,2	1,14 ± 0,25	8,41 ± 0,53	21,95 ± 1,99	-	-

Полученные нами данные частично согласуются с результатами Филипени с соавт., которые рекомендуют в качестве цитокинина при микроклональном размножении ряда сортов *Rhododendron* L. использовать 2иП в концентрации 5 мг/л (в сочетании с 1 мг/л ИУК) [4]. Этот вариант сочетания регуляторов роста оптимален для вечнозеленых сортов рододендрона. Однако для получения генетически однородного материала, а также во избежание дополнительных манипуляций, а следовательно, для оптимизации работ при микроклональном размножении рододендронов (особенно листопадных форм) эти значения необходимо снижать до 3 мг/л 2иП : 0,6 мг/л ИУК.

Таким образом, в результате проведенных исследований подобраны условия стерилизации растительного материала при инициации *in vitro* культуры *Rhododendron* × *hybridum* hort. вечнозеленых сортов Azurro, Marianne von Weizsäcker, Scintillation и листопадных сортов Cannon's Double, Orchid Lights.

Установлено, что наибольший выход стерильного растительного материала получен при проведении двухступенчатой стерилизации по схеме 2. Предварительная обработка фунгицидом позволяет снизить уровень грибной инфекции до 40%. При использовании самой высокой концентрации регуляторов роста (5 мг/л 2иП:1 мг/л ИУК)

наблюдается наибольшее разрастание каллусной ткани, а также образование многочисленных адвентивных побегов. Поэтому для получения генетически однородного материала наилучшим соотношением цитокинин : ауксин для вечнозеленых и листопадных рододендронов является 3 мг/л 2иП : 0,6 мг/л ИУК.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Кондратович, Р. Я. Рододендроны в Латвийской ССР. — Рига: Зинатне, 1981. — 332 с.
2. Бутенко, Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб.пособие / Р.Г. Бутенко. - М. : ФБК–ПРЕСС, 1999. — 160 с.
3. Anderson, W. C. Tissue culture propagation of rhododendrons / W.C. Anderson // *In vitro*. — 1978. — Vol.14. — P. 334.
4. Филипеня, В. Л. Микрклональное размножение *Rhododendron × hybridum hort.* / В.Л. Филипеня, В.И. Горбацевич, Т.В. Антипова // Физиология и биохимия культурных растений, — 2009. — Т. 41, № 6. — С. 516-522.