ЭКОБИОТЕХ
ISSN 2618-964X http://ecobiotech-journal.ru

РАЗМНОЖЕНИЕ *RHODODENDRON LUTEUM* SWEET. В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Мухаметвафина А.А.

Южно-Уральский ботанический сад-институт Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа
E-mail: mukhametvafina@mail.ru

Апробирован метод клонального микроразмножения *Rhododendron luteum* Sweet. с использованием в качестве эксплантов ювенильных растений и черенков с побегов текущего года. Подобраны условия для введения эксплантов *Rh. luteum* в культуру *in vitro*. Выявлены питательные среды для четырех этапов микроклонального размножения (введение, мультипликация, элонгация и укоренение). Выявлен оптимальный субстрат для перевода растений-регенерантов в условия *in vivo*.

Ключевые слова: *Rhododendron luteum* Sweet., культура *in vitro*, микроклональное размножение, питательная среда

REPRODUCTION OF YELLOW RHODODENDRON (*RHODODENDRON LUTEUM* SWEET.) *IN VITRO*

Mukhametvafina A.A.

Botanical Garden-Institute of the Ufa Research Center of the Russian Academy of Sciences, Ufa
E-mail: mukhametvafina@mail.ru

The method of clonal micropropagation of rhododendron yellow was tested using juvenile plants and cuttings from shoots of the current year as explants. The conditions for the introduction of yellow rhododendron explants into the culture in vitro were selected. Nutrient media for four stages of microclonal reproduction were identified. The optimal substrate for the transfer of regenerative plants to in vivo conditions was identified.

Keywords: *Rhododendron luteum* Sweet., *in vitro* culture, microclonal propagation, culture medium

Поступила в редакцию: 3.09.2019

DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-4-451-455

ВВЕДЕНИЕ

Анализ рынка декоративных культур свидетельствует о существенном повышении интереса на новые сорта и виды, обладающими высокодекоративными качествами. В ходе процесса перехода экономики страны к импортозамещению очевидна необходимость сокращения импорта посадочного материала, становится актуальна проблема массового производства декоративных культур внутри России. Проблема может быть успешно решена использованием при размножении ценных растений методов биотехнологии (Милехин, Рубцов, 2015; Шевченко,2015). В связи с этим актуальна разработка технологий микроклонального размножения ценных высокодекоративных культур. Одна из таких культур – это *Rhododendron luteum* Sweet., который давно зарекомендовал себя как прекрасное садовое растение в условиях средней полосы нашей страны. Представляет собой листопадный кустарник до 2 м высотой. Очень декоративен в период цветения, а также осенью благодаря яркой окраске листьев. Цветки диаметром до 6 см собраны в соцветия по 7-12 шт. Цветение начинается уже во время распускания листьев и продолжается этапами, поскольку период цветения долгий. Цветки источают сильный аромат, и уже несколько кустов в саду способны создать южную атмосферу. Испытания показали его полную зимостойкость в Центральном регионе, а также есть сведения об успешной интродукции этого вида на Урале, в Сибири.

Традиционно размножается семенами, зелеными черенками и делением куста. При семенном размножении генеративной фазы достигает на 4-5 год жизни. Зеленое черенкование позволяет получить цветущее растение уже через год, но проблема

заключается в том, что укореняется лишь 20 % черенков даже при обработке регуляторами роста. Прекрасно размножается делением куста, но получить таким образом большое количество растений сложно. Эффективная технология размножения *Rh. luteum in vitro* сможет обеспечить необходимое количество здорового, свободного от вирусов растительного материала (Полетико, 1960; Александрова, 1975; Мишукова, Хрынова, 2014).

Целью нашей работы являлось определение оптимальных условий для размножения *in vitro* высокодекоративного вида *Rh. luteum*, в частности, состава питательной среды, способствующей получению собственно корневых растений-регенерантов и перевода их в условия *in vivo*.

В задачи исследования входило - подбор условий и питательных сред 1) для эксплантирования и получение хорошо растущей стерильной культуры, 2) для получения максимального количества меристематических клонов 3) для укоренения размноженных побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям.

В качестве первичного экспланта использовали 45-дневные ювенильные растения (пророщенные в асептических условиях) и черенки с зеленых и одревесневших побегов текущего года вегетации. Проростки получены из семян, присланных по делектусу и черенки получены со взрослых растений, произрастающих на территории ЮУБСИ УФИЦ РАН.

Работу в асептических условиях, стерилизацию питательных сред и посадочного материала проводили согласно имеющимся рекомендациям (Бутенко, 1964; Калинин и др., 1980; Катаева, Бутенко, 1983). Поверхностную стерилизацию проводили в ламинар-боксе с использованием в качестве стерилизующего агента ртутьсодержащее соединение (диацид) в концентрации 0,1 %.

Культивировали семена и черенки на модифицированной питательной среде по прописи Андерсона (1978) с добавлением регуляторов роста, при температуре 24ºС и 16-часовом фотопериоде.

Для выявления контаминации у семян и черенков культивирование проводили на безгормональной питательной среде по прописи Андерсона (1978).

Семена предварительно обрабатывали 70%-ным раствором этанола в течение 0,5 мин. Экспозиция воздействия составила 3 и 5 мин, затем трижды по 15 мин промывали в автоклавированной дистиллированной воде.

Побеги отмывали в растворе детергента, ополаскивали в проточной воде, затем делили на черенки с 2-3 почками. Далее в асептических условиях обрабатывали 1 мин в 70%-ном растворе этилового спирта, 10 и 20 мин в 0,1%-ном растворе диацида, затем трижды по 15 мин промывали в автоклавированной дистиллированной воде.

Схема стерилизации для семян с экспозицией 3 мин позволила получить 100%-ную стерильность материала, с достаточно высоким процентом жизнеспособности (58,1%).

Для зеленых черенков оптимальной являлась 10 минутная экспозиция диацидом. При этом режиме стерилизации число неинфицированных было немного ниже, чем при 20 минутной экспозиции (67,7% и 80,0% соответственно), но число жизнеспособных выше более, чем в 2 раза (40,4% и 17,8% соответственно).

Хотя стерильность одревесневших черенков была достаточно высока (79,6% при 20-минутной экспозиции), но жизнеспособность эксплантов равнялась нулю, поэтому о них далее упоминаться не будет.

Инициации морфогенетических процессов на эксплантах (ювенильные растения, полученные из семян и микропобеги, полученные с черенков) проводилась на модифицированной питательной среде Андерсона для мультипликации (табл. 1, рис 1).

Для ювенильных растений в условиях культуры *in vitro* характерны следующие типы морфогенеза: каллусогенез и геммогенез.

Каллус формировался трех типов: 1) плотный зернистый зеленого цвета, иногда с красноватым оттенком; 2) рыхлый мелкодисперсный красновато-белого цвета и 3) плотный глобулярный гладкий белого цвета. Первый тип каллуса образовывался в основании экспланта, и именно из этого каллуса шла индукция побегов.

Геммогенез наблюдался непосредственно на проростке путем активации пазушных меристем, также путем индукции почек из каллусной ткани, которая в небольшом количестве образовывалась в основании побега ювенильного растения.

Морфогенез на побегах, полученных с черенков, шел в основном по пути активации пазушных меристем. Получить высокую мультипликацию с использованием зеленых черенков не удалось.

Таблица 1. Среды, используемые для клонального размножения Rh. luteum Sweet.

Состав основной среды по Андерсону (1978)	Концентрация, мг/л	Среда			
		для введения в культуру	для мультипликации побегов	Для элонгации побегов	для укоренения побегов
NH_4NO_3	400	+	+	уменьшенная вдвое концентрация	уменьшенная вдвое концентрация
KNO_3	480	+	+		
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440	+	+		
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	+	+		
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	380	+	+		
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	55,7	+	+		
Na_2ЭДТА$\cdot 2H_2O$	74,5	+	+		
H_3BO_3	6,2	+	+		+
$MnSO_4 \cdot H_2O$	16,9	+	+		+
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,6	+	+		+
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25	+	+		+
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025	+	+		+
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025	+	+		+
Сахароза	30000	+	+	15000	+
Тиамин HCl	0,4	+	+	+	+
Инозит	100	+	+	-	+
Сульфат аденина	80	+	+	+	-
ИУК	1,0	-	+	0,5	+
2iP	5,0	-	-	-	-
БАП	-	-	5,0	0,5	-
ИМК	-	-	-	-	0,5
НУК	-	-	-	-	0,2

Коэффициент мультипликации зависел от количества образовавшихся узлов и в среднем был равен 4,15±1,35. Низкий коэффициент мультипликации можно объяснить тем, что у побегов с черенков ткани уже сильно дифференцированы и у них мало тотипотентных клеток, способных к морфогенезу, в отличие от ювенильных растений.

На модифицированной питательной среде Андерсона для мультипликации экспланты характеризовались высоким коэффициентом мультипликации (77,67±19,69 шт. на эксплант). Высокий коэффициент мультипликации мешает дальнейшему росту новообразовавшихся микропобегов и корнеобразованию на них. Поэтому, прежде чем, микропобеги укоренять, их следует подрастить.

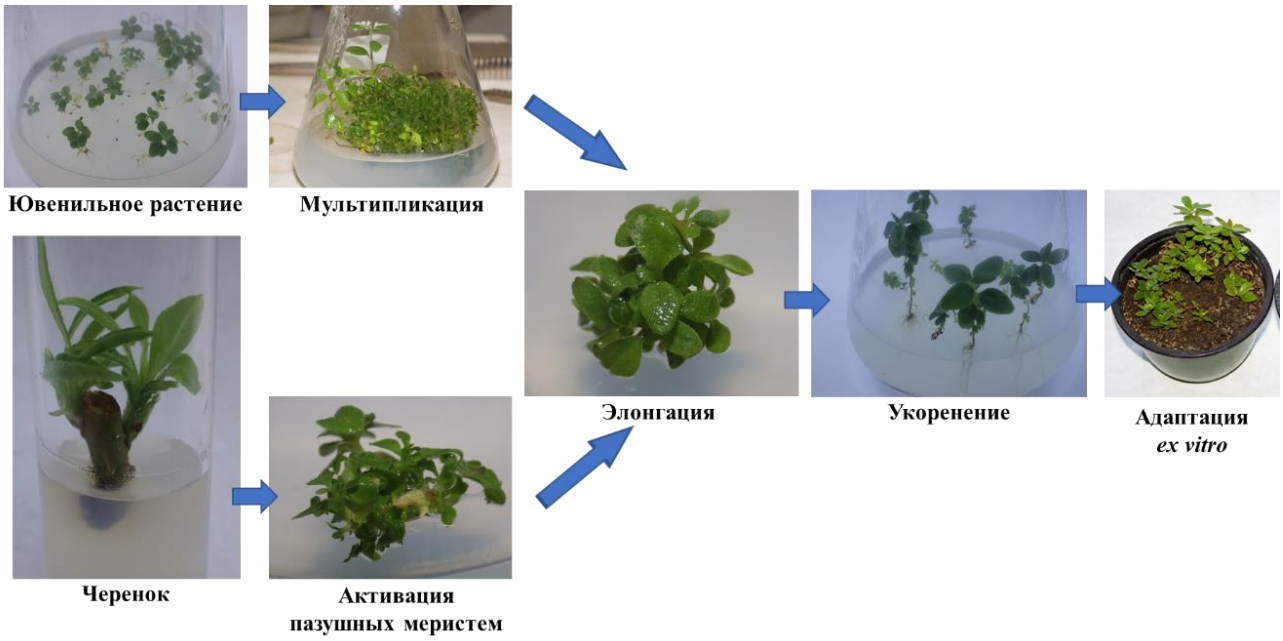

Рис. 1. Этапы размножения *Rhododendron luteum* Sweet. *in vitro*.

Для этого микропобеги небольшими группами высаживали на модифицированную питательную среду для элонгации побегов (табл. 1). В этой среде в 2 раза уменьшили концентрацию микро-, макросолей, железо хелата и сахарозы, изменили состав регуляторов роста (добавили БАП и ИМК по 0,5 мг/л). В итоге на этой среде растений образовывалось заметно меньше, но они были крупнее, более крепкие, с более толстыми стеблями и легко отделялись друг от друга.

Подращенные микропобеги высотой 5-6 см пересаживали на модифицированную питательную среду Андерсона для укоренения (табл. 1). Среда для укоренения содержит уменьшенную вдвое концентрацию макросолей и железо хелата, с добавлением ИМК 0,5 мг/л и НУК 0,2 мг/л, без добавления сульфата аденина. На питательной среде для укоренения кроме формирования корней наблюдается и небольшая мультипликация, что указывает на высокую регенерационную способность *Rh. luteum*.

Таким образом, из двух испытанных эксплантов лучшим оказалось ювенильное растение, у которого на модифицированной питательной среде Андерсона образовывалось 77,67±19,69 шт. микропобегов, что почти в 20 раз выше, чем при использовании зеленых черенков.

Цикл размножения одного растения-регенеранта занимает в среднем 2,5-3 месяца. За год возможно произвести 4-5 циклов. Таким образом, теоретически из одного семени за год возможно получить более 3,5 млн. растений-регенерантов.

Адаптация микропобегов к почвенным условиям является наиболее трудоемким этапом. Для рододендронов, у которых корневая система состоит из тонких нитевидных корней, крайне важно сохранять влажность субстрата в первое время после перевода в условия *ex vitro*. Поэтому первые две недели растения-регенеранты прикрывали укрывным материалом. Через две недели растения понемногу стали приоткрывать, но при этом проводили регулярные опрыскивания.

Для адаптации растений-регенерантов в условиях *in vivo* было испытано 4 варианта субстрата (табл. 2).

Таблица 2. Влияние почвенного субстрата на приживаемость растений-регенерантов *Rh. luteum* Sweet

п/п №	Почвенный субстрат	Соотношение компонентов	Процент приживаемости
1	почва: песок:торф	1:1:1	67,4
2	хвойный опад*:песок	1:1	72,9
3	почва:песок:вермикулит	1:1:0,5	41,3
4	перегной		5,3

Примечание: * - вместе с верхним слоем почвы

Приживаемость на разных субстратах существенно отличалась. В связи с чем, можно утверждать, что состав почвенной смеси для рододендронов играет не последнюю роль.

Исходя из полученных данных выявлено, что оптимальным для перевода растений-регенерантов *Rh. luteum* оказался субстрат из хвойного опада и песка. Вместе с хвойным опадом брали и верхний слой почвы. Растения-регенеранты прекрасно себя чувствовали и шли в рост. Процент приживаемости составил 72,9%. Это лучший результат на испытанных субстратах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова М.С. Рододендроны природной флоры СССР. М.: Наука, 1975.
2. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 272 с.
3. Калинин В.Ф., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наукова думка, 1980. 488 с.
4. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. М.: Наука, 1983. 96 с.
5. Милехин А.В., Рубцов С.Л. Технология микроклонального размножения хризантемы в условия *in vitro* // Молодой ученый, 2015. № 24 (104). С. 335-338.
6. Мишукова И.В., Хрынова Т.Р. Результаты интродукции рододендронов в НИИ Ботанический сад Нижегородского государственного университета. // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2014. № 3. С. 3-5.
7. Полетико О.М. Род 3. Рододендрон – Rhododendron // Деревья и кустарники СССР. Дикорастущие, культивируемые и перспективные для интродукции. / Ред. тома С.Я. Соколов. М., Л.: Изд-во АН СССР, 1960. Т. V. Покрытосеменные. Семейства Миртовые Маслиновые. 544 с.
8. Шевченко С.Н. Самарская наука: ответ на зарубежные санкции. // Агро-Информ, 2015. № 3 (197), С. 36-37.
9. Anderson W.C., Rooting of tissue cultured rhododendrons. // Proc. Int. Plant Proc. Soc. 1978. 28: 135-139.