

УДК 58.085:634.71

## МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ *RHODODENDRON* × *HYBRIDUM* HORT.

В.Л. ФИЛИПЕНЯ, В.И. ГОРБАЦЕВИЧ, Т.В. АНТИПОВА

Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси  
220012 Минск, ул. Сурганова, 2В  
e-mail: veronika\_filipenia@yahoo.com

Отражены результаты исследований по разработке эффективной методики микроклонального размножения *Rhododendron* × *hybridum* hort. сортов PJM Elite, Blutopia, Klondyke, Silver Slipper, Fireball, Naaga, Helliikki, Helsinki University и Peter Tigerstedt. Изучено влияние регуляторов роста на регенерацию побегов *in vitro*. Способность эксплантатов к регенерации побегов при размножении зависела не только от концентрации регуляторов роста, но и от исходного генотипа. Оптимальной средой для укоренения побегов *Rhododendron* × *hybridum* hort. была среда WPM с добавлением 1 мг/л ИМК.

*Ключевые слова:* *Rhododendron* × *hybridum* hort., микроклональное размножение, регенерация *in vitro*, регуляторы роста.

Род *Rhododendron* L. — крупнейший в семействе Ericaceae. Он объединяет более 1200 видов и около 10 000 сортов вечнозеленых, полувечнозеленых, листопадных кустарников и деревьев [2]. Декоративностью листьев, разнообразием форм кустов и, главным образом, красотой соцветий объясняется большая популярность рододендронов во всем мире. Их широкое использование в озеленении ставит задачу обеспечения достаточно высокого темпа увеличения количества посадочного материала новых ценных сортов этой медленно растущей и плохо укореняющейся древесной культуры. Эффективная технология микроклонального размножения рододендронов может обеспечить необходимое количество здорового, свободного от патогенов растительного материала [1, 9]. Известно, что на каждом этапе размножения необходима оптимизация условий культивирования *in vitro* применительно к определенным видам и сортам как в отношении минерального и органического состава питательных сред, физических условий культивирования, так и уровня и соотношения регуляторов роста [9].

Цель работы — оптимизация этапов культивирования *in vitro* перспективных сортов *Rhododendron* × *hybridum* hort. для разработки эффективной методики их микроклонального размножения.

### Методика

В качестве объектов исследований использовали *Rhododendron* × *hybridum* hort. сортов PJM Elite, Blutopia, Klondyke, Silver Slipper, Fireball, Naaga, Helliikki, Helsinki University и Peter Tigerstedt из коллекции растений

Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Для инициации асептических культур однолетние побеги зрелых растений помещали в сосуды с водой и культивировали в климатической камере при температуре  $24 \pm 2$  °С и фотопериоде 16 ч до начала активации почек и роста молодых побегов. Эксплантатами служили черенки растущих побегов с 2–3 пазушными почками. Стерилизацию проводили последовательным погружением растительного материала на 1 ч в 0,4 %-й раствор фунгицида Дитан М-45 с добавлением 0,01 % Tween 20 и на 30 мин — в 8 %-й раствор  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  с добавлением 0,01 % Tween 20. После стерилизации эксплантаты промывали трижды (по 5 мин) стерильной дистиллированной водой и помещали на среду WPM [5] с добавлением 15 мг/л 2-изопентениладенина (2иП), 4 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК), 3 % сахарозы и 0,8 % агара (среда для инициации асептической культуры). Длительность первого субкультивирования составляла 3 мес, последующих — 8 недель.

Действие регуляторов роста на регенерацию (пролиферацию) побегов на этапе собственно размножения исследовали на среде WPM с 3 % сахарозы и со следующими сочетаниями регуляторов роста: 5 мг/л 2иП + 1 мг/л ИУК; 10 мг/л 2иП + 2 мг/л ИУК; 15 мг/л 2иП + 4 мг/л ИУК. Длительность субкультивирования составила 8 недель.

С целью изучения влияния различных типов ауксинов и их концентраций на укоренение побегов исследуемых сортов *Rhododendron* × *hybridum hort.* побеги размноженных *in vitro* растений (по 60 эксплантатов на вариант эксперимента) помещали на среду WPM с половинной концентрацией макросолей и микроэлементов, 2 % сахарозы и со следующими регуляторами роста: 1 мг/л ИУК; 2 мг/л ИУК; 1 мг/л ИМК; 2 мг/л ИМК; 1 мг/л НУК; 2 мг/л НУК. Длительность субкультивирования — 8 недель.

Перед автоклавированием рН всех сред доводили до 4,8–5,0.

Растительный материал культивировали при  $25 \pm 1$  °С под лампами дневного света с интенсивностью освещения 40 мкмоль/(м<sup>2</sup> · с), 16-часовом фотопериоде и 50 %-й относительной влажности воздуха.

Все эксперименты проводили как минимум в трехкратной повторности, полученные результаты обрабатывали с использованием компьютерной программы StatSoft STATISTICA 6.0, отличия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Многие исследователи отмечают значительные трудности при получении культур *in vitro* древесных растений [1, 7, 10]. Почки, молодые побеги и нижняя сторона зрелых листьев рододендронов покрыты волосками, что приводит к сильной бактериальной и грибной контаминации растительной поверхности. Более того, в самих клетках содержится большое количество фенолов и вторичных метаболитов, которые выделяются при поранении, вызывая активацию гидролитических ферментов и некроз растительных тканей [6]. Общеизвестным является и тот факт, что при культивировании древесных растений *in vitro* в качестве исходных эксплантатов предпочтительно использовать эмбриональные и ювенильные ткани: они лучше сохраняют жизнеспособность и быстрее размножаются. Зрелые ткани обладают низкой регенерационной способностью [8]. В то же время на практике, в том числе и при размножении элит-

ных сортов рододендронов, часто возникает проблема воспроизводства именно зрелых растений [3]. Исходя из перечисленного, на этапе инициации *in vitro* культуры рододендронов основные трудности связаны с высокой инфицированностью исходного материала, возрастом эксплантата и его гибелью вследствие фенольного окисления. Чтобы решить эти проблемы, на этапе получения асептических культур *Rhododendron* × *hybridum* hort. сортов PJM Elite, Blutopia, Klondyke, Silver Slipper, Fireball, Naaga, Helligki, Helsing University и Peter Tigerstedt в качестве первичных эксплантатов мы использовали черенки с апикальной или 2–3 пазушными почками активно растущих зеленых побегов, полученных в результате предварительной выгонки в климатической камере однолетних побегов зрелых растений, т.е. онтогенетически молодые ткани.

В предварительном эксперименте была выявлена высокая инфицированность исходного материала. Для снижения степени инфицированности эксплантатов проведена двухступенчатая стерилизация: перед помещением в 8 %-й раствор  $\text{Ca}(\text{ClO})_2$  с добавлением 0,01 % Tween 20 первичные эксплантаты в течение 1 ч выдерживали в 0,4 %-м растворе фунгицида Дитан М-45 с добавлением 0,01 % Tween 20. Результаты эксперимента представлены в табл. 1.

В течение трех–четырех недель культивирования из пазушных почек начинали развиваться побеги. К концу первого пассажа из латеральных меристем эксплантатов сформировались побеги с 2–8 листочками. Побеги отделяли от первичного эксплантата, делили на двухпазушные черенки и высаживали на свежую питательную среду того же состава. На начальном этапе культивирования наибольшее число эксплантатов сохранило жизнеспособность у сортов PJM Elite, Klondyke, Fireball и Helligki, наименьшее — у сортов Peter Tigerstedt и Silver Slipper.

В течение первых трех пассажей коэффициент размножения постоянно возрастал и к окончанию третьего субкультивирования в зависимости от генотипа варьировал от 16 (сорт Silver Slipper) до 31 (сорт PJM Elite).

К четвертому субкультивированию была отмечена стабилизация культур, и впоследствии коэффициент размножения значительно не изменялся. У всех сортов, начиная с четвертого субкультивирования, на

ТАБЛИЦА 1. Результаты первого субкультивирования эксплантатов *Rhododendron* × *hybridum* hort. после проведения двухступенчатой стерилизации

| Сорт               | Эксплантаты     |                   |                                 |
|--------------------|-----------------|-------------------|---------------------------------|
|                    | высаженные, шт. | жизнеспособные, % | с активно растущими побегами, % |
| PJM Elite          | 32              | 50,0              | 34,4                            |
| Blutopia           | 35              | 48,6              | 31,4                            |
| Klondyke           | 35              | 57,1              | 37,1                            |
| Silver Slipper     | 35              | 25,7              | 14,3                            |
| Fireball           | 35              | 57,1              | 34,3                            |
| Naaga              | 35              | 45,7              | 28,6                            |
| Helligki           | 35              | 54,3              | 34,3                            |
| Helsing University | 35              | 45,8              | 25,7                            |
| Peter Tigerstedt   | 35              | 28,6              | 17,1                            |

среде, содержащей 15 мг/л 2иП + 4 мг/л ИУК, наблюдали усиление образования каллуса и развитие аномальных побегов. Специалисты такое явление, как правило, связывают с введением в питательную среду высоких доз цитокининов [4].

С целью оптимизации питательной среды для микроклонирования нами было изучено влияние различных концентраций 2иП и ИУК на морфогенетический потенциал исследуемых сортов *Rhododendron* × *hybridum hort.* На всех вариантах сред у всех сортов спустя 1 неделю была отмечена индукция регенерации побегов (табл. 2), однако интенсивность пролиферации (определяли по показателю коэффициент размножения) к концу субкультивирования была различной и зависела как от сорта растения, так и концентрации фитогормонов в питательной среде. Максимальный коэффициент размножения наблюдали у сорта *Helsinki University* на среде с добавлением 15 мг/л 2иП и 4 мг/л ИУК. Этот показатель для других сортов был также наиболее высоким на питательной среде того же состава. Однако следует отметить, что высокая концентрация фитогормонов приводила к активному каллусообразованию и регенерации из каллусных клеток адвентивных побегов, большинство из которых было витрифицировано, тогда как общей чертой, характерной для всех сортов при культивировании на средах с 5 мг/л 2иП и 1 мг/л ИУК, был незначительный рост каллуса и регенерации побегов без каких-либо признаков витрификации, что является важным показателем при клонировании с целью сохранения у регенерантов сортовых признаков. Установлено, что на этой среде высокая интенсивность пролиферации побегов характерна для сортов *Naaga* (16,7) и *Helsinki University* (16,8), наивысшая — для сорта *PJM Elite* (17,1). Самую низкую способность к регенерации проявил сорт *Silver Slipper* (10,4).

Таким образом, наши эксперименты по культивированию исследуемых сортов *Rhododendron* × *hybridum hort.* на средах с различным содержанием регуляторов роста подтвердили большое значение фитогормонов для регенерации, продемонстрировав значительные различия в способности к пролиферации побегов в зависимости от соотношения и концентрации этих биологически активных соединений [1].

ТАБЛИЦА 2. Коэффициент размножения различных сортов *Rhododendron* × *hybridum hort.* в зависимости от концентрации фитогормонов и их соотношения

| Сорт                       | Регулятор роста            |                            |                           |
|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
|                            | 15 мг/л 2иП,<br>4 мг/л ИУК | 10 мг/л 2иП,<br>2 мг/л ИУК | 5 мг/л 2иП,<br>1 мг/л ИУК |
| <i>PJM Elite</i>           | 26,4 ± 2,1                 | 19,4 ± 1,1                 | 17,1 ± 1,2                |
| <i>Blutopia</i>            | 17,3 ± 1,4                 | 12,9 ± 0,9                 | 10,8 ± 0,8                |
| <i>Klondyke</i>            | 21,3 ± 1,6                 | 18,4 ± 0,6                 | 15,6 ± 0,9                |
| <i>Silver Slipper</i>      | 16,1 ± 1,2                 | 12,3 ± 0,7                 | 10,4 ± 1,1                |
| <i>Fireball</i>            | 29,5 ± 1,1                 | 21,7 ± 1,6                 | 14,1 ± 1,7                |
| <i>Naaga</i>               | 27,4 ± 1,9                 | 19,5 ± 0,9                 | 16,7 ± 0,7                |
| <i>Hellikki</i>            | 29,5 ± 1,1                 | 21,7 ± 1,6                 | 14,1 ± 1,7                |
| <i>Helsinki University</i> | 31,3 ± 2,3                 | 24,3 ± 1,2                 | 16,8 ± 0,9                |
| <i>Peter Tigerstedt</i>    | 23,8 ± 1,6                 | 16,1 ± 1,5                 | 12,9 ± 1,4                |

ТАБЛИЦА 3. Влияние концентрации ИУК на укоренение различных сортов *Rhododendron* × *hybridum hort.*

| Сорт                | ИУК, 1 мг/л   |                       | ИУК, 2 мг/л   |                       |
|---------------------|---------------|-----------------------|---------------|-----------------------|
|                     | Укоренение, % | Каллюсообразование, % | Укоренение, % | Каллюсообразование, % |
| PJM Elite           | 40,0 ± 1,7    | 21,7 ± 1,7            | 48,3 ± 1,6    | 38,3 ± 1,7            |
| Blutopia            | 31,7 ± 1,6    | 20,0 ± 1,7            | 38,3 ± 3,4    | 28,3 ± 1,7            |
| Klondyke            | 33,3 ± 1,7    | 16,7 ± 3,6            | 40,0 ± 3,3    | 23,3 ± 1,6            |
| Silver Slipper      | 36,7 ± 3,0    | 16,7 ± 1,6            | 41,7 ± 1,7    | 20,0 ± 3,3            |
| Fireball            | 31,7 ± 5,0    | 25,0 ± 1,7            | 38,3 ± 1,7    | 28,3 ± 3,4            |
| Haaga               | 36,7 ± 1,7    | 16,7 ± 3,4            | 48,3 ± 1,7    | 23,3 ± 1,6            |
| Hellikki            | 41,7 ± 1,7    | 25,0 ± 1,6            | 48,3 ± 3,6    | 35,0 ± 1,7            |
| Helsinki University | 36,7 ± 1,3    | 18,3 ± 3,3            | 46,7 ± 2,6    | 26,7 ± 5,0            |
| Peter Tigerstedt    | 33,3 ± 1,7    | 16,7 ± 1,3            | 40,0 ± 2,6    | 21,7 ± 1,7            |

Размноженные *in vitro* растения необходимо подготовить к переходу на автотрофное питание и пересадке в субстрат. На этом этапе их, как правило, перемещают на среды с уменьшенным содержанием углеводов, микроэлементов, макроэлементов и включающие ауксины, необходимые для индукции адвентивного корнеобразования.

При микроклональном размножении древесных растений в качестве регуляторов роста с ауксиновой активностью чаще всего используют ИУК, ИМК и НУК. Оптимальный для каждой культуры тип ауксина и его концентрацию необходимо подбирать эмпирически. В экспериментах по оптимизации корнеобразования использовали побеги *Rhododendron* × *hybridum hort.* размером 2—2,5 см, которые помещали на среду WPM с половинной концентрацией макроэлементов и микроэлементов, 2 % сахарозы и регуляторами роста с ауксиновой активностью (ИУК, ИМК, НУК) в различных концентрациях.

Анализ данных, полученных при изучении влияния различных типов ауксинов и их концентраций на эффективность корнеобразования исследуемых сортов *Rhododendron* × *hybridum hort.* (табл. 3—5), а также визуальная оценка эксплантатов позволили сделать следующие выводы.

Эффективность ризогенеза зависела от типа и концентрации регулятора роста и не имела четко выраженной сортоспецифичности. Добавление в среду ИУК в концентрации как 1, так и 2 мг/л слабо индуцировало регенерацию корней у побегов рододендрона всех исследуемых сортов (корнеобразование наблюдали менее чем у 50 % эксплантатов), хотя формирование каллюса на срезе побегов под действием данного типа ауксина было минимальным. Добавление в питательную среду ИМК в концентрации 1 мг/л максимально стимулировало корнеобразование, при этом развитие каллюса на срезе побега было незначительным (диаметр не более 0,5 см). Укоренение побегов достигало 90—97 % (сорты Haaga, Hellikki, Helsinki University, Peter Tigerstadt, Blutopia, Silver Slipper, Fireball), у сортов PJM Elite и Klondyke — составило 100 %. Увеличение содержания ИМК в среде до 2 мг/л усилило образование каллюсной ткани на эксплантатах, особенно в местах соприкосновения со средой.

Использование НУК в концентрации как 1, так и 2 мг/л, приводило к замедлению роста черенков и образованию значительного количе-

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ *RHODODENDRON* × *HYBRIDUM HORT.*

ТАБЛИЦА 4. Влияние концентрации ИМК на укоренение различных сортов *Rhododendron* × *hybridum hort.*

| Сорт                | ИМК, 1 мг/л   |                       | ИМК, 2 мг/л   |                       |
|---------------------|---------------|-----------------------|---------------|-----------------------|
|                     | Укоренение, % | Каллюсообразование, % | Укоренение, % | Каллюсообразование, % |
| PJM Elite           | 100           | 100                   | 100           | 100                   |
| Blutoria            | 90,0 ± 5,0    | 100                   | 95,0 ± 3,4    | 100                   |
| Klondyke            | 100           | 100                   | 100           | 100                   |
| Silver Slipper      | 90,0 ± 3,0    | 96,7 ± 1,3            | 95,0 ± 1,7    | 100                   |
| Fireball            | 95,0 ± 0,0    | 100                   | 95,0 ± 1,7    | 100                   |
| Haaga               | 98,3 ± 1,3    | 100                   | 98,3 ± 1,3    | 100                   |
| Hellikki            | 96,7 ± 1,7    | 100                   | 93,3 ± 1,7    | 100                   |
| Helsinki University | 98,3 ± 0,0    | 100                   | 98,3 ± 1,7    | 100                   |
| Peter Tigerstedt    | 95,0 ± 3,4    | 100                   | 96,7 ± 3,0    | 100                   |

ТАБЛИЦА 5. Влияние концентрации НУК на укоренение различных сортов *Rhododendron* × *hybridum hort.*

| Сорт                | НУК, 1 мг/л   |                       | НУК, 2 мг/л   |                       |
|---------------------|---------------|-----------------------|---------------|-----------------------|
|                     | Укоренение, % | Каллюсообразование, % | Укоренение, % | Каллюсообразование, % |
| PJM Elite           | 96,7 ± 1,3    | 100                   | 95,0 ± 2,0    | 100                   |
| Blutoria            | 88,8 ± 5,3    | 100                   | 85,0 ± 1,4    | 100                   |
| Klondyke            | 88,8 ± 1,5    | 100                   | 83,3 ± 2,7    | 100                   |
| Silver Slipper      | 85,3 ± 2,5    | 100                   | 81,7 ± 1,3    | 100                   |
| Fireball            | 83,3 ± 3,0    | 100                   | 81,1 ± 1,0    | 100                   |
| Haaga               | 95,0 ± 1,4    | 100                   | 91,7 ± 0,0    | 100                   |
| Hellikki            | 93,3 ± 1,3    | 100                   | 88,9 ± 1,9    | 100                   |
| Helsinki University | 96,7 ± 0,0    | 100                   | 93,3 ± 1,3    | 100                   |
| Peter Tigerstedt    | 91,7 ± 3,4    | 100                   | 83,3 ± 3,0    | 100                   |

ства рыхлого каллюса у оснований побегов и на листьях, контактирующих с питательной средой, вызвало некроз верхушек побегов у части эксплантатов, снизив при этом интенсивность образования корней.

Таким образом, в результате проведенных исследований подобраны условия стерилизации растительного материала при инициации *in vitro* культуры *Rhododendron* × *hybridum hort.* сортов PJM Elite, Blutoria, Klondyke, Silver Slipper, Fireball, Haaga, Hellikki, Helsinki University и Peter Tigerstedt. Оптимизированы концентрации фитогормонов в зависимости от числа субкультивирований, установлено, что для эффективного укоренения исследуемых сортов предпочтительно использовать ИМК в концентрации 1 мг/л.

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. — М.: ФБК-Пресс, 1999. — 160 с.
2. Кондратович Р.Я. Рододендроны в Латвийской ССР. — Рига: Зинатне, 1981. — 332 с.

3. *Bonga J.M.* Clonal propagation of mature; problems and possible solutions // *Cell Tissue Cult. In Forestry*. — 1987. — **1**. — P. 249—271.
4. *Gaspar Th.* The concept of cancer in vitro plant cultures and the implication habituation to hormones and hyperhydricity // *Plant Tissue Cult. and Biotechnol.* — 1995. — **1**, N 3. — P. 126—136.
5. *Lloyd G., McCown B.* Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture // *Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc.* — 1980. — **30**. — P. 421—427.
6. *Pierik R.L.M.* Relative dormancy in excised vegetative buds of *Rhododendron* // *Netherl. J. Agr. Sci.* — 1976. — **24**, N 2. — P. 98—104.
7. *Pierik R.L.M.* In vitro culture of higher plants. — Dordrecht: Martinus Nijhoff Publ., 1987. — 60 p.
8. *Pierik R.L.M.* Rejuvenation and micropropagation // *Progress in Plant Cell and Mol. Biol. Proc. VII Int. Congr. Plant Tissue and Cell Cult. (June 24—29, 1991, Amsterdam)*. — Amsterdam, 1990. — P. 91—101.
9. *Pierik R.L.M.* Commercial aspects of micropropagation. — Netherlands: Kluwer Acad. Publ., 1991. — 347 p.
10. *Strode R.E., Travers P.A., Oglesby R.P.* Commercial micropropagation of rhododendron // *Proc. Int. Plant Soc.* — 1979. — **29**. — P. 439—443.

Получено 12.05.2009

#### МИКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ *RHODODENDRON* × *HYBRIDUM* HORT.

*В.Л. Філіпеня, В.І. Горбацевич, Т.В. Антипова*

Центральний ботанічний сад Національної академії наук Білорусі, Мінськ

Відображено результати досліджень щодо розробки ефективної методики мікроклонального розмноження *Rhododendron* × *hybridum* hort. сортів PJM Elite, Blutopia, Klondyke, Silver Slipper, Fireball, Наага, Hellikki, Helsinki University і Peter Tigerstedt. Вивчено вплив регуляторів росту на регенерацію пагонів in vitro. Здатність експлантатів до регенерації пагонів під час розмноження залежала не тільки від концентрації регуляторів росту, а й від вихідного генотипу. Оптимальним середовищем для укорінення пагонів *Rhododendron* × *hybridum* hort. було середовище WPM із додаванням 1 мг/л ІМК.

#### MICROCLONAL PROPAGATION OF *RHODODENDRON* × *HYBRIDUM* HORT.

*V.L. Filipenia, V.I. Garbatsevich, T.V. Antsipava*

Central Botanical Gardens, National Academy of Sciences of Belarus  
2B ul. Sarganova, Minsk, 220012, Belarus

The results of investigation on development of microclonal propagation effective methods of *Rhododendron* × *hybridum* hort. cultivars PJM Elite, Blutopia, Klondyke, Silver Slipper, Fireball, Naaga, Hellikki, Helsinki University and Peter Tigerstedt have been presented. The influence of growth regulators on the regeneration of shoot in vitro is studied. It was stated that the ability of explant to shoot regeneration depends on the type and concentration of growth regulators and the original genotype. It was established that WPM medium containing 1 mg/l IBA is optimal for *Rhododendron* × *hybridum* hort. shoot rooting.

*Key words:* *Rhododendron* × *hybridum* hort., microclonal propagation, in vitro regeneration, growth regulators.