

АДАПТАЦИЯ РЕГЕНЕРАНТОВ *RHODODENDRON HYBRIDUM* К УСЛОВИЯМ *EX VITRO***А.А. Эрст****Т.И. Новикова****А.В. Каракулов****Ю.Г. Зайцева**

Центральный сибирский
ботанический сад СО РАН,
Россия, 630090, Новосибирск,
ул. Золотодолинская, 101

E-mail: annaerst@yandex.ru;
tin27@mail.ru; krk@inbox.ru;
ulianna@ngs.ru

Показан эффективный способ адаптации растений-регенерантов *Rhododendron hybridum* hort. сорта Cunningham's White к условиям *ex vitro* с использованием гидропонной установки. Применяемый двухстадийный способ адаптации обеспечивает хорошее развитие корневой системы регенерантов и их высокую приживаемость в почвенных субстратах.

Ключевые слова: *Rhododendron hybridum*, адаптация к условиям *ex vitro*, гидропоника.

Введение

Адаптация растений-регенерантов к условиям *ex vitro* является самой критической стадией микроразмножения для многих видов растений. Проблемы на этом этапе напрямую связаны с целым рядом анатомических и физиологических особенностей листьев растений-регенерантов: 1) низкое количество кутикулярного воска и слабо развитая хлоренхима; 2) невысокая фотосинтетическая способность; 3) слабая деятельность устьичного аппарата приводит к потере большого количества воды и необратимому обезвоживанию растений-регенерантов [1]. Кроме того, у большинства регенерантов в условиях *in vitro* не происходит образования корней второго порядка и корневых волосков. Таким образом, формируется специфический «культуральный фенотип» растения [2]. Поэтому основной целью этапа адаптации регенерантов к условиям *ex vitro* является устранение названных «дефектов».

Процесс адаптации заключается в создании высокой влажности для надземной части растений с последующим ее понижением и подборе оптимальных условий для роста корней. Существенное число растений, выращенных *in vitro*, не выживают после перенесения их в нестерильные условия – вегетационные камеры и полевые условия. Такие условия имеют более низкие показатели влажности и освещенности, которые являются стрессом для растений. Кроме того, растения-регенеранты во время адаптации вынуждены переходить от миксотрофного к фотоавтотрофному способу питания.

Значительные усилия были приложены для оптимизации основных стадий микроразмножения, но процесс акклиматизации растений к нестерильным условиям, на данный момент изучен недостаточно. Следовательно, перенос растений в условия *ex vitro* является «узким местом» в процессе микроразмножения [1, 3].

Для адаптации рододендронов чаще всего используют теплицы, оранжереи или мини-теплицы, где создается повышенная влажность. Создать условия для дальнейшего роста и развития не только надземной части, но и корневой системы удается за счет подбора субстратов. Используемые для рододендронов субстраты – перлит или торф – перлит в разных соотношениях [4, 5, 6], сфагновый мох [7], сфагновый мох : вермикулит [8], торф и песок : хвойная земля [9]. Схожие составы субстратов использованы и для адаптации других представителей семейства Ericaceae [10, 11, 12, 13]. Однако прямой перенос регенерантов в твердые субстраты может привести к потере материала, поскольку корни, сформировавшиеся в условиях *in vitro*, отличаются ломкостью и чувствительны к механическим повреждениям [14]. Использование гидропонных систем не только позволяет решить эту проблему, но и контролировать поступление необходимых питательных веществ и постепенное снижение относительной влажности [15].

Цель исследования – подобрать оптимальные условия для адаптации *Rhododendron hybridum* hort. сорта Cunningham's White к условиям *ex vitro* с использованием гидропонной системы.

Объекты и методы исследования

Объект исследования – *Rhododendron hybridum* Hort. сорта Cunningham's White. Культивирование *in vitro* проводили по описанной ранее методике [16]. Микропобеги укореняли на

безгормональной среде Андерсона [17], с уменьшенным вдвое содержанием минеральных элементов, предварительно обрабатывая базальные части микропобегов раствором β-индолилмасляной кислоты (ИМК) 30 мг/л в течение 4 часов [9].

Адаптацию растений-регенерантов проводили на гидропонной установке, аналогичной системе «Минивит». Для этого растения отмывали от агара в дистиллированной воде и закрепляли в вегетационную кювету гидропонной установки. Период адаптации составил 20 суток. Гидропонную установку заполняли питательным раствором (30 л) по прописи 1/2 Андерсона, модифицированную по содержанию NaH_2PO_4 и NH_4NO_3 .

Адаптированные на гидропонике растения высаживали в почвенный субстрат и выращивали в условиях теплицы.

Все эксперименты проводились в 2–3 повторностях. Статистическая обработка результатов осуществлялась путем расчетов с использованием пакета статистического анализа приложения Microsoft Excel. В таблицах показаны средние арифметические величины и доверительные интервалы. Доверительность оцениваемых показателей принимали на уровне значимости $P < 0.05$ [18].

Результаты и их обсуждение

Эффективность использования гидропонных установок типа «Минивит-0,35» показана для земляники садовой, примулы пругоницкой, смородины золотистой, голубики топяной и др. [19]. При этом установлено, что оптимальный рост растений достигается при использовании двухстадийной адаптации на гидропонике. Первые 10 суток использовали питательный раствор с увеличенной концентрацией фосфора, что обеспечивает рост корневой системы, следующие 10 суток – раствор с повышенным содержанием азота, что позволяет получить хорошо развитые побеги и листья. Для адаптации регенерантов *Rhododendron hybridum* мы использовали среду Андерсона, она богата фосфатами, поэтому на первом этапе адаптации применяли 1/2 Андерсона, оставив нередуцированной концентрацию $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (380 мг/л) (раствор I). На втором этапе использовали также 1/2 Андерсона, но с полным содержанием NH_4NO_3 (400 мг/л) (раствор II) (табл. 1).

Таблица 1

Состав питательных сред, используемых для адаптации регенерантов *Rhododendron hybridum* Hort. сорта Cunningham's White на гидропонной установке

| Минеральные компоненты среды Андерсона | Содержание минеральных компонентов в I растворе (1–10 сутки адаптации), мг/л | Содержание минеральных компонентов во II растворе (11–20 сутки адаптации), мг/л |
|--|--|---|
| NH_4NO_3 | 200 | 400 |
| KNO_3 | 240 | 240 |
| $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 185 | 185 |
| $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ | 220 | 220 |
| $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ | 380 | 190 |
| $\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ | 8.45 | 8.45 |
| $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ | 4.3 | 4.3 |
| H_3BO_3 | 3.1 | 3.1 |
| KI | 0.15 | 0.15 |
| $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.013 | 0.013 |
| $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ | 0.013 | 0.013 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.125 | 0.125 |
| $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ | 27.85 | 27.85 |
| $\text{Na}_2\text{ЭДТА} \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 37.25 | 37.25 |

Первые 5–7 суток адаптации к условиям *ex vitro* создавали повышенную влажность, для этого растения накрывали прозрачной пленкой. Постепенное снижение влажности достигали за счет использования полиэтилена с перфорациями. Это позволило успешно пройти этап структурной перестройки листа (приобретение ксероморфной структуры, изменения в мезофилле листа) и избежать потерь растений-регенерантов на заключительном этапе микроразмножения.

Представленные в таблице 2 данные свидетельствуют о закономер-

ном увеличении всех параметров роста и развития регенерантов *Rh. hybridum* в период их адаптации (рис. 1а; 2). Интенсивно развивалась корневая система за счет роста уже имеющихся (в 1.5 раза), образования новых корней через 10 дней адаптации (в 1.3 раза) и развитию большого количества корней второго порядка. Побеги увеличились в длину в 1.4 раза.



Таблица 2

Характеристики развития регенерантов *Rhododendron hybridum* Hort. сорта Cunningham's White до и после адаптации на гидропонной установке, n=20

| Показатели роста и развития | Перед адаптацией | После адаптации | Через 6 месяцев после адаптации |
|-----------------------------|------------------|-----------------|---------------------------------|
| Высота растения, см | 2.5±0.4 | 3.7±0.3 | 7.4±0.4 |
| Количество корней, шт. | 5.9±1.8 | 8.7±1.3 | – |
| Средняя длина корней, мм | 12.4±3.0 | 19.4±2.3 | – |
| Количество листьев, шт. | 7.3±0.7 | 9.1±0.8 | 11.2±1.1 |
| Длина листа, мм | 7.1±0.4 | 7.6±1.3 | 40.5±4.6 |
| Ширина листа, мм | 4.5±0.6 | 5.1±0.8 | 18.6±2.1 |

Примечание: «–» – нет данных



Рис. 1. Внешний вид растений-регенерантов *Rhododendron hybridum* Hort. сорта Cunningham's White на стадии адаптации к условиям *ex vitro*: а) до (слева) и после (справа) адаптации на гидропонной установке; б) через 6 месяцев после высадки в почвенный субстрат

Через 20 дней адаптации на гидропонной установке растения высаживали в почвенную смесь, состоящую из 1/3 верхового торфа, 1/3 дерновой земли и 1/3 органических материалов (хвойная земля, перепревшая сосновая кора). Растения содержали в условиях теплицы с октября по май. В целом хорошо развитая корневая система растений обеспечила их высокую приживаемость в почвенном субстрате. Замеры были сделаны через 6 месяцев. За этот период высота побега увеличилась более чем в 2 раза, заметно увеличился размер листовой пластинки. Лист приобрел вытянутую форму, длина его увеличилась в 5 раз, ширина в 3.5 раза (рис. 1б).

Таким образом, использование гидропонной установки для адаптации растений-регенерантов *Rh. hybridum* оказалось эффективным на данном сложном, критическом этапе микроразмножения.



Рис. 2. Растения-регенеранты *Rhododendron hybridum* Hort. сорта Cunningham's White во время адаптации на гидропонной установке

Способ адаптации с применением этой установки выгодно отличается от существующих способов по следующим показателям [20]:

- компактность установки в сочетании с возможностью одновременного выращивания до 1000 растений-регенерантов на площади 0.35 м²;
- универсальность установки, что позволяет адаптировать разные виды растений, причем одновременно;
- уменьшение трудоемкости процесса;
- 100% адаптация растений-регенерантов;
- высокая воспроизводимость полученных результатов.

Заключение

Таким образом, проведенные исследования показали, что двухстадийный прием адаптации растений-регенерантов *Rhododendron hybridum* hort. сорта Cunningham's White к условиям выращивания *ex vitro* с использованием гидропонной установки характеризуется эффективностью и позволяет получать растения с хорошо развитой корневой системой. При этом первые 10 суток гидропонную установку заполняли раствором 1/2 Андерсона с полным составом $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (380 мг/л), последующие 10 суток – 1/2 Андерсона с нередуцированным составом NH_4NO_3 (400 мг/л).

Список литературы

1. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions / J. Pospisilova, I. Ticha, P. Kadlecik et al. // *Biologia Plantarum*. – 1999. – Vol. 42(2). – P. 481–497.
2. Гилолашвили Т.С., Родькин О.Н., Реуцкий В.Г. Условия микроклонирования формируют специфический культуральный фенотип // VII Междунар. Конф. «Биология клеток растений *in vitro*, биотехнология и сохранение генофонда»: Тез. докл. – М., 1997. – С. 413.
3. Hazarika B.N. Acclimatization of tissue-cultured plants // *Current Science*. – 2003. – Vol. 85, №12. – P. 1704–1712.
4. Doina C., Fira Al. Tissue culture and *ex-vitro* acclimation of *Rhododendron* sp. // *Buletin USAMV-CN*. – 2007. – Vol. 64, №1–2. – P. 39–43.

5. Almeida R., Goncalves S., Romano A. In vitro micropropagation of endangered *Rhododendron ponticum* L. subsp. *baeticum* (Boissier and Reuter) Handel-Mazzetti // *Biodiversity and Conservation*. – 2005. – №14. – P. 1059–1069.
6. Кутас Е.Н. Клональное микроразмножение рододендронов и их практическое использование. – Минск, 2009. – 188с.
7. Matysiak B. Effect of flight intensity on growth and chlorophyll fluorescence of *Rhododendron* microcuttings during acclimatization // *Folia Horticulturae*. – 2004. – Ann. 16/1. – P. 107–114.
8. Keith V.M., Brand M.H. Influence of culture age, cytokinin level and retying on growth and incidence of brooming in micropropagated *Rhododendrons* // *J. Environ. Hort.* – 1995. – Vol. 13(2). – P. 72–77.
9. Васильева О.Г. Биолого-морфологические основы клонального микроразмножения некоторых представителей рода *Rhododendron* L.: Автореф. диссер. ... к-та биол. наук. – 2009. – 20 с.
10. Protocol for micropropagation of *Vaccinium vitis-idaea* L. / A. Gajdosova, M.G. Ostrolucka, G. Libiakova, E. Ondruskova // *Protocol for micropropagation of woody trees and fruits*. – 2007. – P. 445–464.
11. Song G.-Q., Sink K.C. Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) // *Agrobacterium protocols*. – 2006. – Vol. 2. – P. 264–272.
12. Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry / T. Tetsumura, Y. Matsumoto, M. Sato et al. // *Sci. Hortic.* – 2008. – Vol. 119, №1. – P. 72–74.
13. Debnath S.C. In vitro culture of lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait.) // *Proceedings of the ninth North American blueberry research and extension workers conference*. – 2004. – Vol. 3, №1–2 and №3–4. – P. 393–407.
14. Supporting material influences the root growth and morphology of sweet potato plantlets cultured photoautotrophically / F.A. Zobayed, S.M. Zobayed, C. Kubota, T. Kozai // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*. – 1999. – Vol. 35. – P. 470–476.
15. In vitro regeneration and acclimatization of plants of Turmeric (*Curcuma longa* L.) in hydroponic system / E.V. Zapata, G.S. Morales, A.H. Lauzardo et al. // *Biotechnologia Aplicada*. – 2003. – Vol. 20. – P. 25–31.
16. Эрст А.А., Каракулов А.В. Размножение *Rhododendron hybridum* в культуре *in vitro* // *Международная научно-практическая конференция, посвященная 100-летию со дня рождения З.И. Лучник «Декоративное садоводство Сибири. Проблемы и перспективы»*. – Барнаул, 2010. – С. 192–195.
17. Anderson W.S. Mass propagation by tissue culture: principles and techniques // *Proceedings of conference. On nursery production of fruit plants through tissue culture-applications and feasibility*. – Maryland, 1980. – P. 1–10.
18. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М., 1990. – 352 с.
19. Адаптация растений-регенерантов с использованием гидропоники / Н.А. Вечернина, О.К. Таварткиладзе, И.Д. Бородулина, А.А. Эрст // *Известия АлтГУ*. – 2008. – №3 (55). – С. 7–10.
20. Вечернина Н.А. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений: монография. – Барнаул, 2004. – 205 с.

ADAPTATION OF REGENERANTS RHODODENDRON HYBRIDUM TO EX VITRO CONDITION

A.A. Erst
T.I. Novikova
A.V. Karakulov
Y.G. Zaytseva

*Central Siberian Botanical Garden,
Siberian Branch of RAS,
Zolotodolinskaya St., 101, Novosibirsk,
630090, Russia*
E-mail: annaerst@yandex.ru;
tin27@mail.ru; krk@inbox.ru;
ulianna@ngs.ru

The effective way of adaptation of regenerants *Rhododendron hybridum* Hort. Cunningham's White varieties to *ex vitro* conditions using hydroponic system is described. Two-stage process of the adaptation provides a well-developed root system regenerants and their high survival rate in soil substrates.

Key words: *Rhododendron hybridum*, adaptation *ex vitro*, hydroponics.