



УДК 635.9:631.53]:582.688.3

MICROCLONAL REPRODUCTION OF DECORATIVE PLANTS OF THE GENUS RHODODENDRON L.**МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ ДЕКОРАТИВНИХ РОСЛИН РОДУ RHODODENDRON L.****Andreieva V. V. / Андреева В.В.***s.ag.s., as.prof. / к.с.-г.н., доц.*

ORCID: 0000-0003-4276-1660

Shepeliuk M. O. / Шепелюк М. О.*s.ag.s., as.prof. / к.с.-г.н., доц.*

ORCID: 0000-0002-9234-8324

*Lesya Ukrainka Volyn National University, Lutsk, Voly Street 13, 43025**Волинський національний університет імені Лесі Українки,**м. Луцьк, вул. Воли 13, 43025*

Анотація. В роботі розглядається відпрацювання ефективної методики мікроклонального розмноження видів роду рододендрон з урахуванням їх фізіологічних особливостей, яка б дала змогу за короткий термін забезпечити вітчизняне розсадництво масовим, високоякісним, безвірусним вихідним садивним матеріалом цих рослин.

Ключові слова: мікроклональне розмноження, стерилізуючі розчини, рододендрон.

Abstract. The paper considers the development of an effective method of microclonal reproduction of species of the genus *Rhododendron*, taking into account their physiological characteristics, which would allow in a short time to provide nurseries with mass, high quality, virus-free planting material of these plants.

Key words: microclonal reproduction, sterilizing solutions, *rhododendron*.

Вступ. Перспективним способом розмноження декоративних культур є клональне мікророзмноження, яке полягає в одержанні в умовах *in vitro* рослин нестатевим шляхом, генетично ідентичних вихідному екземпляру. В основі методу лежить унікальна здатність рослинної клітини реалізовувати притаманну їй тотипотентність, тобто під впливом екзогенних чинників давати початок цілому рослинному організмові. Метод клонального мікророзмноження має ряд переваг порівняно з традиційними способами розмноження: отримання генетично однорідного, безвірусного садивного матеріалу; високий коефіцієнт розмноження; скорочення селекційного процесу; прискорення переходу рослин від ювенільної до репродуктивної фази розвитку; розмноження рослин, які погано розмножуються традиційними способами; можливість проведення робіт протягом всього року; можливість автоматизації процесу вирощування.

Перераховані характеристики демонструють доцільність впровадження у виробництво даного способу. Тому сьогодні актуальним завданням є розробка і удосконалення технологій клонального мікророзмноження рослин роду рододендрон. Мікроклональне розмноження дає можливість продукувати масовий ідентичний безвірусний посадковий матеріал. Тому детальне дослідження всіх технологічних етапів виробництва, з урахуванням фізіологічних особливостей досліджуваних видів є актуальним на даному етапі розвитку галузі.



Матеріали та методи дослідження. Вплив стерилізуючих речовин на отримання асептичних експлантів при культивуванні їх в умовах *in vitro* вивчався на прикладі рододендрону жовтого, Шліпенбаха та щільного. Ми використовували в якості головних стерилізуючих речовин розчини гіпохлориду натрію або білизну (NaClO) 30 % та двохлористу ртуть або сулему (HgCl_2) 0,1 %, додатково був 3 % перекис водню (H_2O_2). Живильне середовище, на якому культивувались експланти, було універсальне середовище Мурасіге-Скуга, що використовується для мікроклонального розмноження великої кількості декоративних та сільськогосподарських рослин.

Вибір видів рододендронів для експерименту був зумовлений їх попитом при озелененні та досить проблематичним розмноженням в умовах *in vitro*. Тобто з одного боку ці види є перспективними на ринку декоративних рослин, а з другого – розмноження, що проводиться класичним вегетативним та генеративним способом, відтягує початок цвітіння на 3-4 роки пізніше ніж при мікроклональному [1]. Підготовка меристемних тканин до експерименту відбувалась за загальноприйнятою методикою [2].

В межах одного дослідження проводилися такі роботи. Після нарізання інтактних рослин відбувалося вичленення по 2 експланти з апікальними та інтеркалярними меристемами кожного виду рододендрону. На 5 сантиметровий відрізок бинта викладали експланти та зав'язували їх в клубок. Добре зав'язавши клубок бинту з експлантами, занурювали його на 15 хв. в попередньо підготовлений мильний розчин. Після розчину експланти підставляли під проточну воду на 15 хв. Ці дві процедури проводились в стерилізуючій кімнаті з метою очищення поверхні експлантів від бруду й пилу. Наступні дії проводяться в абсолютно стерильній кімнаті під витяжками в ламінарному боксі. Клубок з промитими експлантами занурювали в абсолютний етиловий спирт на 30 секунд для руйнування воскового шару. Після спирту експланти звільняли із бинтового клубка та занурювали в стерилізуючу речовину, що в окремо взятому досліді була різною так само, як і час перебування експлантів у кожному розчині.

Після білизни експланти витримували в перекисі водню, час експозиції змінювався в кожному експерименті. Простерилізовані експланти промивались двічі по 10 хв. в дистильованій воді, після чого їх виклали на фільтрувальний папір в чашці Петрі.

Перед введенням експлантів на живильне середовище за допомогою стерильного скальпелю та пінцету видаляються відмерлі частини експлантів, які зруйнувалися під час стерилізації. Введення експлантів на живильне середовище виконується за допомогою стерильного пінцету, який стерилізується шляхом занурення його в 96 % етиловий спирт та пропалюванням його над спиртівкою кожного пасажу.

Живильне середовище, на яке розміщують експланти, знаходиться в закритих стерильних ємностях, перед пасажем ємність тримають декілька секунд над спиртівкою та відкривають її, ввівши експлант, ємність та кришечку знову підносять до спиртівки на декілька секунд та добре закривають.

Після закінчення введення експлантів кожна ємність підписується та



переноситься до термальної кімнати, де експланти культивуються при температурі + 22–25 ° С. Для стерильних умов використовуються кварцові лампи, які вмикаються автоматично за допомогою реле часу.

Основною проблемою розмноження декоративних рослин досліджуваного роду є їх надмірна опушеність, яка покриває всю епідермічну тканину на всіх вегетативних органах рослин, а саме на пагонах, бруньках та жилках листків, які використовувалися, як вихідний матеріал в наших дослідженнях.

Ця родова особливість рослини рододендронів значно впливає на культивування їх експлантів в умовах *in vitro*. В лабораторних умовах ми досліджували дане явище під стереоскопічним мікроскопом МБС-10.

Результати та обговорення. Оглянувши частини досліджуваних рослин, було відмічено, що в рододендронів жовтого та Шліпенбаха ця опушеність досить виражена, а в рододендрона щільного ця ознака є незначною. Наявність опушення на експлантах ускладнює процес повної їх стерилізації для подальшого їх культивування в асептичних умовах, що в свою чергу призводить до бактеріального та грибового зараження культивованих експлантів. Також при клональному мікророзмноженні рододендронів ми зауважили надмірну кількість фенольних виділень. Ця проблема є досить суттєвою, адже вихідні експланти, такі як листки, бруньки та нездерев'янілі живці є найбільш фенольновмісними порівняно з напівздерев'янілими та здерев'янілими вегетативними органами рододендронів.

Вміст фенольних сполук у культивованих тканинах зумовлений співвідношенням ауксин: цитокінін. Стосовно кореляції вмісту фенольних сполук і здатності морфогенезу, відомо, що утворення пагонів у калусній тканині у деяких культур спостерігається при зниженні вмісту природних фенольних сполук [2]. Ініціація коренеутворення відбувається при низькому вмісті фенольних сполук, а от ріст новоутворених резистентних органів потребує вищої їх концентрації.

Тому при мікроклональному розмноженні рододендронів необхідно досить ретельно підбирати стерилізуючі речовини та час експозиції стерилізації експлантів для уникнення заражень інтактних рослин.

Варіанти експериментів та зміна експозицій замочування експлантів у розчинах стерилізуючих речовин наведена в таблиці 1.

Таблиця 1 - Дослідні показники експериментів

№ експерименту	Назва та розчин стериліантів у %		Час експозиції замочування, хв.	
	Головного	Додаткового	Головного	Додаткового
1	NaClO 30%	H ₂ O ₂ 3%	7	2
2	NaClO 30%	H ₂ O ₂ 3%	2	2,5
3	NaClO 15%	H ₂ O ₂ 3%	4	4
4	NaClO 15%	H ₂ O ₂ 3%	2	3
5	NaClO 15%	H ₂ O ₂ 3%	3	2
6	NaClO 15%	H ₂ O ₂ 3%	3,5	3,5
7	HgCl ₂ 0,1%,	H ₂ O ₂ 3%	5	2,5
8	HgCl ₂ 0,1%,	H ₂ O ₂ 3%	3	2,5



З метою вивчення особливостей дії стерилізуючих речовин на експланти після введення їх на живильне середовище були проведені візуальні спостереження за життєздатністю експлантів за такими критеріями як повна нежиттєздатність експлантів, зараження живильного середовища та експлантів бактеріальним і грибковим ураженням.

З таблиці 2 можна зробити висновки, що за використанням стерилізуючих речовин та часу стерилізації експлантів у них, відносно задовільний результат показав рододендрон щільний (у варіантах експериментів №6 та №8 по 50 % живих експлантів, які можуть бути використані для подальшого субкультивування для ініціації калюсу або морфогенезу). Рододендрон Шліпенбаха показав 100 % відпаду у варіантах дослідів №1 та №7, у всіх інших відбувалося грибкове та бактеріальне ураження. Експланти рододендрону жовтого теж показали свою нестійкість до використовуваних стерелізуючих речовин та до бактеріального та грибкового зараження.

Таблиця 2 - Значення основних показників загального стану експлантів рододендронів, %

Показники стану	№ експериментів							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Рододендрон жовтий – Rhododendron luteum Sweet</i>								
Грибкове ураження	-	100	-	100	50	-	-	-
Бактеріальне ураження	-	-	-	-	50	100	-	100
Загибель експлантів	100	-	100	-	-	-	100	-
Асептичні умови	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Рододендрон Шліпенбаха – Rhododendron Shlippenbachii Maxim</i>								
Грибкове ураження	-	50	-	100	50	-	-	50
Бактеріальне ураження	-	50	50	-	50	100	-	50
Загибель експлантів	100	-	50	-	-	-	100	-
Асептичні умови	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Рододендрон щільний – Rhododendron Rhododendron impeditum Balf. f. Et W. W. Smith</i>								
Грибкове ураження	-	-	50	100	-	-	-	-
Бактеріальне ураження	-	100	50	-	100	-	-	50
Загибель експлантів	100	-	-	-	-	50	100	-
Асептичні умови	-	-	-	-	-	50	-	50

Аналіз отриманих даних дослідження дозволяє зробити наступні **висновки**. Мікроклональне розмноження є суттєво перспективним напрямком для отримання високоякісного садивного матеріалу з цінними спадковими властивостями у вітчизняному розсадництві та дозволяє використовувати цей посадковий матеріал в садово-парковому будівництві. Розмноження рослин роду рододендрон в умовах *in vitro* при дотриманні всіх виробничих вимог сприяє більш повній реалізації морфогенетичного потенціалу, що дозволяє отримувати велику кількість мікроклонів з відповідними спадковими ознаками інтактної рослини. У трьох досліджуваних видів при проведенні дослідів було



виявлено опушеність епідермічного шару, що на нашу думку суттєво вплинуло на етап стерилізації експлантів. Підтвердженням цього є той факт, що у рододендрону щільного було виявлено найменшу опушеність і у варіантах досліду №6 та №8 ми отримали по 50 % неінфікованих життєздатних експлантів. Про надмірну феноломісткість свідчить той факт, що при культивуванні експлантів в умовах *in vitro* на різних модифікаціях живильного середовища MS не спостерігалось калюсоутворення та ініціації морфогенезу. Присутні регулятори росту в живильному середовищі MS не підходять для субкультивування експлантів досліджуваних рослин роду рододендрон. Мікроклональний метод розмноження для роду рододендрон є досить трудомістким, але доцільним при повному вивченні всіх аспектів цього способу розмноження та потребує глибшого вивчення проблем.

В якості експлантів можемо рекомендувати використовувати бруньки. Найкращі результати при стерилізації бруньок рододендрону щільного було отримано при обробці 0,1 % розчином сулими (HgCl_2) 3 хв і перекисом водню (H_2O_2) 2,5 хв., де відсоток асептичних експлантів становив 50 %, на нашу думку для отримання 100 % виходу асептичної культури експозицію стерилізації у сулимі необхідно збільшити до 4 хв. Також 50 % вихід незараженого посадкового матеріалу показав дослід з використанням 15 % білизни (NaClO) час замочування експлантів в якій становив 3,5 хв. та в 3 % перекисом водню (H_2O_2) замочування теж 3,5 хв. По стерилізації експлантів ми рекомендуємо використовувати білизну, яка є доступна для загального використання, і для отримання 100 % асептичного посадкового матеріалу рекомендуємо зменшити час замочування в ній до 3 хв. Щодо використання ростових речовин, які входять до складу живильного середовища MS, то вони є неефективними для ініціації морфогенезу або калюсоутворення досліджуваних видів роду рододендрон.

Література

1. Бекер М. Е., Лиепінш Г. К., Рай-пулис Е. П. Биотехнология. М.: Агропромиздат, 1990. 334 с.
2. Кушнір Г. П., Сарнацька В. В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. К.: Наук. думка, 2005. 272 с.