

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ВЕЙГЕЛЫ ПРИЯТНОЙ И ВЕЙГЕЛЫ ПЕСТРОЛИСТНОЙ «KOSTERIANA VARIEGATA»

О. А. Землянухина, В. Н. Калаев, В. С. Воронина

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 13.01.2016 г.

Аннотация. Разработаны и оптимизированы условия получения активно пролиферирующих культур краснокнижной вейгелы приятной и вейгелы пестролистной «Kosteriana Variegata». Отработаны условия ризогенеза: укоренение вейгелы приятной происходило на безгормональной среде, для вейгелы пестролистной «Kosteriana Variegata» на среде с добавлением 1 мг/л индолилмасляной кислоты. Культивирование растений проводили на светокультуральных стеллажах в условиях 16-часового периода с добавлением лент с красными фотодиодами.

Ключевые слова: вейгела приятная, вейгела пестролистная «Kosteriana Variegata», стерилизация, антибиотик, микроклональное размножение, ризогенез

Abstract. The goal of this research is to establish protocol for micropropagation of red-listed brush *Weigela suavis* and weigela «Kosteriana Variegata». Stem sterilization were effected with following antibiotic treatment. The best results were obtained with ½ WPM medium supplemented with 0.2 mg/l BA plus 0.1 mg/l GA₃. Rooting of regenerated shoot explants was successful on hormone free medium (*Weigela suavis*) or on ½ Murashige and Skoog medium with the addition 1.0 mg/l indole-3-butyric acid being rooted during a week (weigela «Kosteriana Variegata»). It is offered to utilize light emitting diode shelves.

Keywords: *Weigela suavis*, weigela «Kosteriana Variegata», sterilization, antibiotic,

Род вейгела (*Weigela*) относится к отделу *Magnoliophyta* классу *Magnoliopsida* и насчитывает в природе около 15 видов кустарников, произрастающих в основном в Восточной и Юго-восточной Азии. На юге Дальнего Востока России встречаются три вида: вейгела ранняя (*Weigela praecox* (Lemoine) Bailey), вейгела Миддендорфа (*Weigela middendorffiana* (Carrière) K. Koch) и вейгела приятная (*Weigela suavis* (Kom.) L.H.Bailey). Вейгела приятная занесена в Красную книгу Хабаровского края и в культуре встречается весьма редко. По мнению специалистов, это одна из самых изящных вейгел, к тому же отличающаяся хорошей зимостойкостью в средней полосе России. Вейгела приятная обладает еще одним достоинством: она цветет розово-фиолетовыми цветками дважды в

году: со второй декады мая до конца июня и с конца августа до середины сентября.

Вейгела пестролистная «Kosteriana Variegata» – это низкорослый кустарник, пользующийся спросом у садоводов и отличающийся желтой каемкой на листе, что придает растению дополнительную привлекательность после цветения.

В настоящее время для получения плантационных количеств редких и декоративных растений все большее распространение приобретает метод микроклонального размножения, когда из одной пазушной почки можно получить необходимое количество однородного безвирусного посадочного материала, сохраняющего свойства материнского растения [1,2]. Особенно это относится к пестролистным формам, семенное размножение для которых неприемлемо из-за утраты декоративности листьев [3]. Целью настоящего

исследования была разработка метода получения активно пролиферирующей культуры двух вейгел – вейгелы приятной и вейгелы пестролистной «Kosteriana Variegata» в культуре ткани, а также образования у растений-регенерантов корневой системы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве исходного материалы взяты черенки с кустов вейгел в мае 2015 г. Поверхностную стерилизацию проводили в несколько этапов. С веток обрезали листья, нарезали на сегменты с 2-3 пазушными почками, промывали на качалке в дистиллированной воде, содержащей 1 каплю бытового моющего средства для посуды «AOS бальзам», в течение 10 мин. Затем сосуды с растениями помещали под проточную воду для смыывания основной сапрофитной микрофлоры, после чего дополнительно промывали дистиллированной водой (10 минут). Дальнейшие работы проводили в стерильных условиях ламинар-бокса. Растения переносили в стерильные банки, накрытые фольгой, заливали раствором, содержащим 4 % хлор-содержащего средства «Белизна» и 0.01-0.02 % противогрибкового антисептика мертиолята (орто-этилртутьтисалицилат натрия). После трехкратной отмывки по 5 минут в стерильной дистиллированной воде растения нарезали на части, содержащие 1 пазушную почку. Первичные экспланты заглубляли до почки в питательную среду Woody Plant Medium (WPM) или $\frac{1}{2}$ WPM [4], Мурасиге и Скуга (MS) или $\frac{1}{2}$ MS [5], дополненные 0.2 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) + 0.1мг/л гиббереллина (GA_3). Питательные среды содержали 7 г/л агара при pH 5.6-5.8, автоклавированы 20 минут при 1,1 атмосфере.

Укоренение осуществляли на $\frac{1}{2}$ MS или на $\frac{1}{2}$ WPM, содержащих 1 мг/л индолилмасляной кислоты (ИМК), или 1 мг/л ИМК+1 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК), или на безгормональных $\frac{1}{2}$ MS и $\frac{1}{2}$ WPM. Работы проводили в стерильных условиях ламинар-бокса.

Культивирование проводили на светокультуральных стеллажах в условиях 16-часового периода освещения светодиодными лентами напряжением 12 В, мощностью 4.5 Вт/м (3 светодиода на 10 см ленты), общая освещенность 2500-3000 люкс. На каждой полке добавлена лента с красными фотодиодами (рис.1).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета статистических программ «Stadia». Процедура группировки данных

и их обработка изложены в работе Кулаичева [6]. Сравнение числа и длины побегов у эксплантов, выращиваемых на средах с разным минеральным составом, осуществляли с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Развитие побегов из прорастающих почек протекало на протяжении четырех месяцев (рис.2). При получении необходимого для исследований количества изолированных растений исходные экспланты выбрасывали, несмотря на то, что они сохраняли способность к микроразмножению.



Рис. 1. Светокультуральные стеллажи с дополнительными красными светодиодами для получения регенерантов in vitro

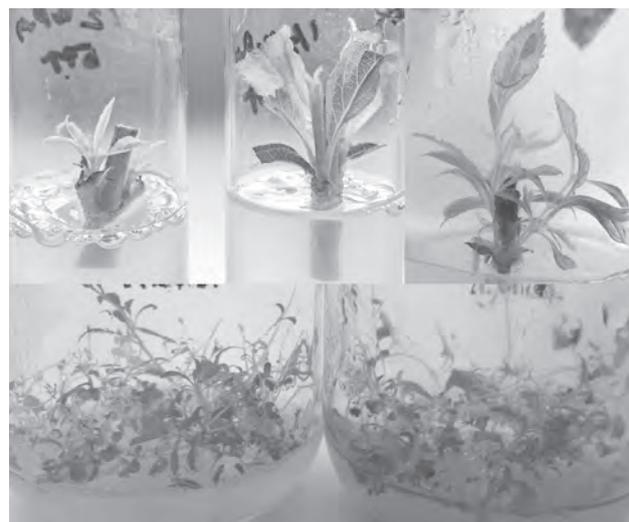


Рис. 2. Образование адвентивных побегов из пазушных почек вейгелы пестролистной «Kosteriana Variegata» на разных стадиях развития

Регенерационная способность эксплантов в значительной степени зависела от состава питательной среды при том, что гормональный состав был постоянен: 0.2 мг/л БАП и 0.1 мг/л ГА₃. На средах ½ MS и MS количество побегов как для вейгелы приятной, так и для вейгелы пестролистной было ниже, чем на средах ½ WPM и WPM (табл. 1).

Кроме того, для получения максимального количества регенерантов имел значение минеральный состав сред: на средах с половинным количеством макроэлементов и сахарозы число побегов было выше, чем на средах с полным солевым составом. Способность к регенерации в значительной степени варьировала от вида вейгелы. На черенках вейгелы приятной из пазушной почки в течение недели образовывались 3-5 побегов, достигая к концу первого месяца инкубации 12-20 растений, тогда как для вейгелы пестролистной «Kosteriana Variegata» этот показатель был ниже и составил 5-6 растений в оптимальных условиях (среда ½ WPM).

Субкультивирование и микрочеренкование на свежие среды проводилось один раз в месяц.

Результаты укоренения микрочеренков на ½ MS или ½ WPM с добавлением 1 мг/л ИМК, или 1 мг/л ИУК, или безгормональных средах приведены в таблице 2.

Укоренение микрочеренков вейгелы приятной происходило спонтанно на среде мультипликации, дополненной 0.2 мг/л БАП + 0.1 мг/л ГА₃ без добавления гормонов ризогенеза, практически все микрорастения укоренялись на ½ WPM, после

чего их переносили на безгормональную среду того же состава для дальнейшей мультипликации или подращивания перед высадкой в нестерильные условия. Для ризогенеза вейгелы пестролистной «Kosteriana Variegata» процесс укоренения требовал гормонального толчка, которым служило добавление 1 мг/л ИУК или – предпочтительнее – 1 мг/л ИМК. Образование корней наблюдалось в течение двух недель, после чего растения, также как в случае вейгелы приятной, переносили на безгормональную среду (рис.3).

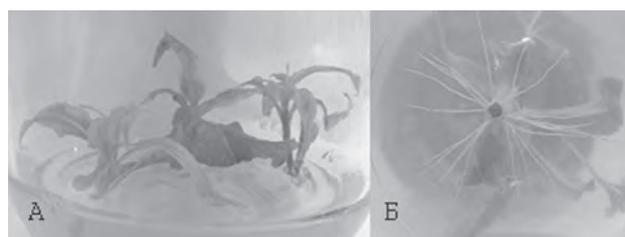


Рис. 3. Рост, развитие и образование корней у растений вейгелы пестролистной «Kosteriana Variegata» и вейгелы приятной. Обозначения: А – одиночные микрорастения вейгелы пестролистной «Kosteriana Variegata»; Б – образование и рост корней у растения вейгелы приятной

Таким образом, нами была получена активно пролиферирующая культура двух видов вейгел, подобрана и оптимизирована питательная среда для роста, развития и укоренения микроклонально размноженных растений.

Таблица 1.

Влияние среды культивирования на мультипликацию побегов вейгелы приятной и вейгелы пестролистной «Kosteriana Variegata» при микроклональном размножении

Питательная среда	Число побегов/эксплант (за месяц)		Длина главного побега, см (за месяц)	
	Вейгела приятная	Вейгела пестролистная	Вейгела приятная	Вейгела пестролистная
MS	8.2±0.52*	3.0±0.46	3.3±0.64	2.0±0.37
½ MS	12.7±0.38	3.7±0.72	4.2±0.95	2.7±0.42
WPM	15.3±0.61*	4.1±0.38	5.2±0.76	2.8±0.18*
½ WPM	18.9±0.59	4.7±0.98	5.7±0.92	3.1±0.12

Обозначения:

* - различия со средой с половинным количеством макроэлементов и сахарозы достоверно (P<0,05)

Таблица 2.

Влияние гормонального состава питательных сред на корнеобразование вейгелы приятной и вейгелы пестролистной «Kosteriana Variegata» при микроклональном размножении

Вид вейгелы	% укоренения					
	½ MS			½ WPM		
	Без гормонов	ИМК	ИУК	Без гормонов	ИМК	ИУК
Вейгела приятная	90	90	90	90	90	90
Вейгела пестролистная «Kosteriana Variegata»	нет	75	60	нет	75	60

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Учеб. Пособие / Р.Г. Бутенко. — М.: ФБК-ПРЕСС, 1991. — 160 с.
2. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р.Г. Бутенко. — М.: Наука, 1964. — 272 с.
3. Катаева Н.В. Клональное микроразмножение растений / Н.В. Катаева, Р.Г. Бутенко. — М.: Наука, 1983. — 96 с.
4. Lloyd G. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture / G. Lloyd, B. McCown // Proc. Inter. Plant Prop. — 1980. — V. 30. — P. 421-427.
5. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiologia Plantarum. — 1962. — V. 15. — P. 473-497.
6. Кулаичев А.П. Методы и средства комплексного анализа данных / А.П. Кулаичев. — М.: ФОРУМ: ИНФА, 2006. — 512 с.

Ботанический сад им. проф. Б.М. Козо-Полянского Воронежского государственного университета

Землянухина О. А., канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник.

Тел.: (473) 2208876.

E-mail: oz54@mail.ru

Воронежский государственный университет

Калаев В. Н., докт. биол. наук, проф. кафедры генетики, цитологии и биоинженерии

Телефон: (473) 2208876.

E-mail: Dr_Huixs@mail.ru

Воронина В. С., аспирант кафедры генетики, цитологии и биоинженерии

Телефон: (473) 2208876.

E-mail: vs_fedorova@pochta.ru

Botanical Garden named. prof. B.M, Kozo-Polyansky, Voronezh State University

Zemlianukhina O. A., PhD, senior research worker

Ph.: (473) 2208876.

E-mail: oz54@mail.ru

Voronezh State University

Kalaev V. N., Doctor of biology, professor of the Dept. of Genetics, Cytology and Bioengineering,

Phone: (473) 2208876.

E-mail: Dr_Huixs@mail.ru

Voronina V. S., Postgraduate student of the Department of genetics, cytology and Bioengineering,

Phone: (473) 2208876.

E-mail: vs_fedorova@pochta.ru