

Сохранение *in vitro* и микроразмножение *Rhododendron yedoense* var. *poukhanense* (H. Lév.) Nakai., индуцированное тидаизуроном

Ю. Г. ЗАЙЦЕВА

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН
630090, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101
E-mail: ulianna_zaitseva@mail.ru

Статья поступила 12.05.2024

После доработки 28.05.2024

Принята к печати 10.06.2024

АННОТАЦИЯ

Представлена эффективная система регенерации *Rhododendron yedoense* var. *poukhanense* (H. Lév.) Nakai. из проростков, основанная на использовании тидаизурина (ТДЗ) для пролиферации меристем. В качестве эксплантов использовали проростки, полученные в результате прорастания семян *in vitro*. Длительность прорастания семян составила 24 дня. Общая всхожесть семян *R. yedoense* var. *poukhanense* была на уровне 77,5 %. Исследовали влияние ТДЗ при 4-часовой импульсной обработке (7,5; 15,0; 30,0 мкМ) с последующим культивированием на среде Андерсона (АМ) без ТДЗ и при непосредственном культивировании на АМ с добавлением 1,0 мкМ ТДЗ на морфогенный потенциал проростков. Установлено, что регенерантам *R. yedoense* var. *poukhanense*, полученным как после импульсной обработки, так и после культивирования на ТДЗ-содержащей среде, требовался дополнительный пассаж на безгормональной АМ (АМ0) для элонгации и увеличения числа побегов на экспланте. Наибольшее число побегов на экспланте получено после элонгации при непосредственном внесении в питательную среду 1,0 мкМ ТДЗ и после импульсной обработки 30,0 мкМ ТДЗ – в среднем 9,32 и 10,32 соответственно. Максимальный процент укорененных растений (50 %) был получен под действием 4-часовой импульсной обработки индолилмасляной кислотой с последующим культивированием *in vitro* на АМ0. Представленное исследование впервые демонстрирует влияние различных видов обработки ТДЗ на пролиферацию и развитие побегов, а разработанная технология позволила получить укорененные и адаптированные микропобеги, развитие которых было индуцировано импульсной обработкой ТДЗ. В результате *R. yedoense* var. *poukhanense* включен в коллекцию *in vitro* для сохранения и размножения с целью дальнейшего практического использования.

Ключевые слова: *Rhododendron yedoense* var. *poukhanense*, прорастание семян *in vitro*, микроразмножение, тидаизурон, укоренение *in vitro*.

ВВЕДЕНИЕ

Rhododendron yedoense var. *poukhanense* (H. Lév.) Nakai. произрастает в светлых сосновых лесах, предпочтительно на солнечной стороне каменистых склонах гор, у ручьев с влажными почвами во всех регионах Кореи, а также в Японии [Jung et al., 2007]. Это листопадный или полувечнозеленый кустарник © Зайцева Ю. Г., 2024

высотой около 0,6–1,0 м с узкоэллиптическими или ланцетными листьями около 3–8 см длиной и 1–2 см шириной. Цветки обладают ароматом, почти сидячие, собраны по 2–3. Венчик широковоронковидной формы диаметром 5 см имеет бледно-лилово-фиолетовый окрас с пурпурно-коричневыми вкраплениями. Благодаря зимостойкости, компактности

куста и обильному цветению *R. yedoense* var. *poukhanense* имеет большой потенциал для селекционных работ. Кроме того, это растение богато общим содержанием фенолов и флавоноидов [Lee et al., 2011]. Экстракты из цветков *R. yedoense* var. *poukhanense* обладают высокой антиоксидантной активностью [Jung et al., 2007], а ингибирующий потенциал ацетилхолинэстеразы в сочетании с сильной антиоксидантной активностью и большим количеством фенольных соединений указывает на эффективность *R. yedoense* var. *poukhanense* в профилактике и/или лечении нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона [López et al., 2009].

Широко известно, что методы *in vitro* являются одним из наиболее эффективных инструментов сохранения генетических ресурсов *ex situ* и использования их в дальнейшей селекции, а также разработки эффективных систем производства биологически активных соединений. В этой связи необходима разработка надежных протоколов введения в культуру *in vitro* и дальнейшего клonalного микроразмножения *R. yedoense* var. *poukhanense*. Ключевыми факторами, определяющими эффективность систем регенерации *in vitro*, являются выбор исходного материала, экзогенных регуляторов роста растений и генетическая стабильность растений микралального происхождения. В то же время при сохранении *in vitro* дикорастущих видов, таких как *R. yedoense* var. *poukhanense*, необходимо также поддерживать их генетическую гетерогенность, своюственную виду в целом. С этой точки зрения наиболее подходящим исходным материалом для создания и поддержания генетического разнообразия видов в коллекциях *in vitro* являются семена и полученные из них проростки [Benson, 2000]. Однако, несмотря на то, что для некоторых представителей рода *Rhododendron* L. разработаны методы культивирования *in vitro* [Eeckhaut et al., 2010], для *R. yedoense* var. *poukhanense* таких протоколов с использованием семян в настоящее время не существует.

Проростки в культуре тканей *in vitro* проявляют высокий морфогенный потенциал, что позволяет инициировать широкий спектр морфогенных реакций в ответ на экзогенное воздействие регуляторами роста растений. В качестве экзогенного цитокинина для запуска

процессов регенерации рододендронов *in vitro* чаще всего используется 2-изопентиладенин [Anderson, 1984; Eeckhaut et al., 2010]. Однако для размножения *in vitro* рододендронов из азиатской части России, таких как *R. dauricum* L., *R. mucronulatum* Turcz., *R. sichotense* Pojark. и *R. schlippenbachii* Maxim., более эффективными цитокининами оказались зеатин и тиодиазурон (ТДЗ) [Novikova, Zaytseva, 2018]. Таким образом, размножение *in vitro* представителей рода *Rhododendron* осложняется генотипическими различиями морфогенетических реакций на всех этапах клonalного микроразмножения, включая укоренение и адаптацию к условиям *ex vitro*, поэтому уже разработанные протоколы не могут с успехом быть использованы для других представителей рода [Briggs et al., 1994; Eeckhaut et al., 2010; Zaytseva et al., 2016]. Насколько нам известно, в настоящее время в литературе отсутствуют данные о способах клonalного микроразмножения *R. yedoense* var. *poukhanense*. В настоящей работе впервые представлена эффективная система введения в культуру *in vitro* и клonalного микроразмножения из семян, основанная на пролиферации меристем проростков. В представленном исследовании проанализирован эффект различных методов обработки ТДЗ проростков на пролиферацию и развитие побегов. Полученные результаты позволяют пополнить коллекцию *in vitro* для сохранения генетических ресурсов *R. yedoense* var. *poukhanense* и для дальнейшего их пользования в программах размножения, реинтродукции, селекции, а также получения биологически активных соединений.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для получения стерильной культуры семян *R. yedoense* var. *poukhanense* (семена получены из Ботанического сада-института ДВО РАН) стерилизовали в 0,2%-м растворе натрия гипохлорита (20 % “Доместос”; Unilever, Россия) в течение 20 мин с последующей 3-кратной промывкой в стерильной дистиллированной воде. Стерильные семена помещали в чашки Петри на поверхность водного раствора агара (0,6 %). Семена прорашивали под люминесцентными лампами с интенсивностью освещения $40 \text{ мкМоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ при 16-часовом фотопериоде и температуре $23 \pm 2^\circ\text{C}$.

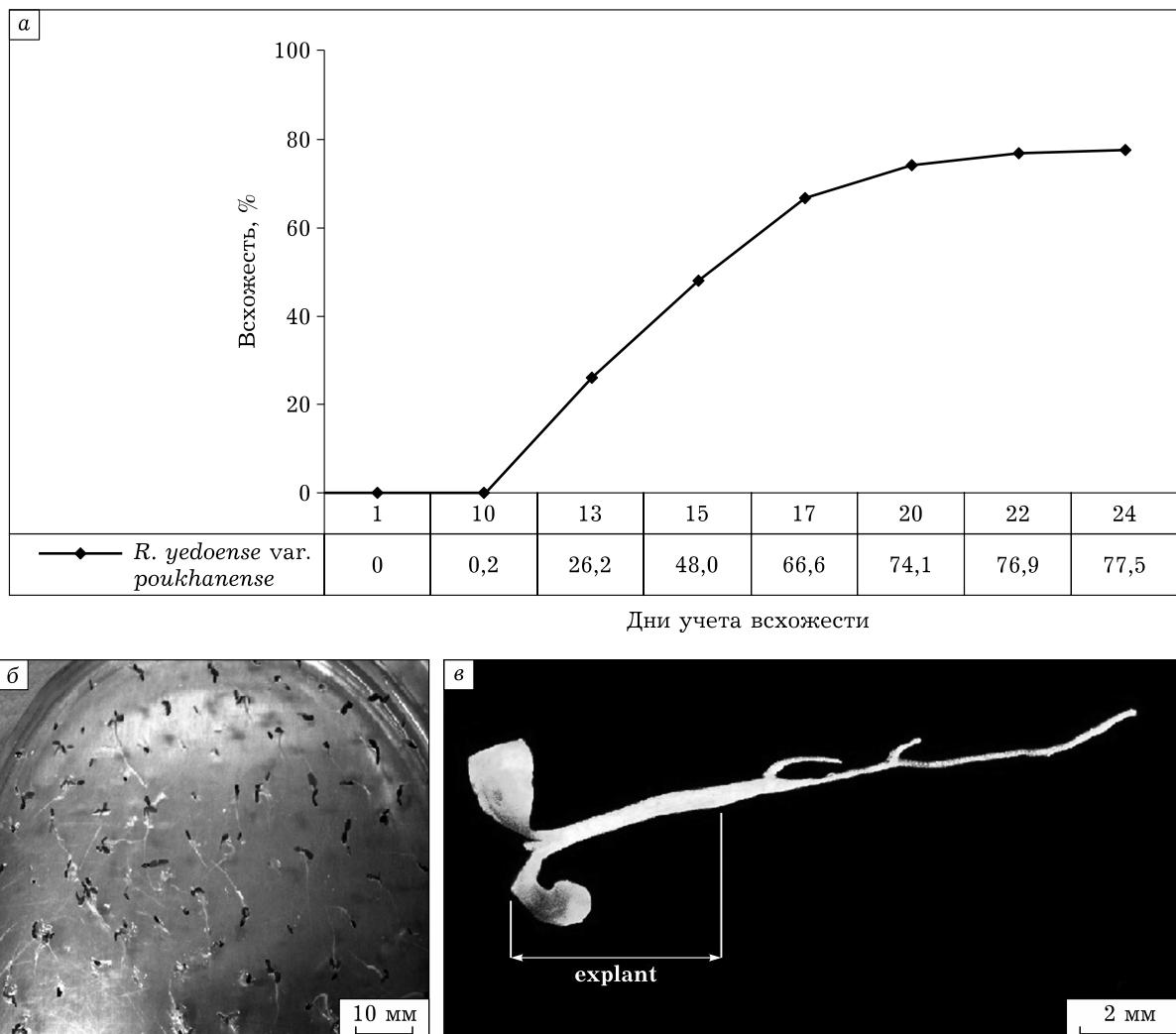


Рис. 1. Динамика всхожести *in vitro* семян *R. yedoense* var. *poukhanense* и изоляция эксплантов

Полученные *in vitro* стерильные проростки служили материалом для изоляции эксплантов. В качестве эксплантов использовали сегменты проростков, содержащие гипокотиль, семядоли и почку (рис. 1, в). Изолированные экспланты переносили на агаризованные среды по прописи Андерсона (АМ) [Anderson, 1984], дополненные регуляторами роста. При исследовании морфогенного потенциала проростков испытывали действие ТДЗ при импульсной обработке и при внесении в среды. Для выявления влияния импульсной обработки проростки без корешков погружали в водный раствор ТДЗ в концентрациях 7,5, 15,0 и 30,0 мкМ и замачивали в течение четырех часов. Затем экспланты промакивали на стерильной бумаге и помещали на безгормональную АМ (АМ0). Через восемь недель культивирования подсчитывали частоту

регенерации (в %), число побегов на эксплант и высоту регенерантов. Затем регенеранты повторно переносили на свежую АМ0 и подсчитывали число побегов на эксплант и высоту побегов. При внесении в среду ТДЗ экспланты культивировали на АМ, дополненной 1,0 мкМ ТДЗ в течение восьми недель. Подсчитывали частоту регенерации, и затем конгломераты побегов переносили на АМ0 для элонгации, после чего определяли коэффициент размножения и высоту побегов. При подсчете числа побегов на эксплант во всех вышеописанных экспериментах учитывали только побеги высотой не менее 5 мм.

Полученные регенеранты *R. yedoense* var. *poukhanense* укореняли в условиях *in vitro* или *ex vitro*. Для стимуляции ризогенеза использовали два подхода: 1) непосредственное

культивирование на АМ, дополненной 25,0 мкМ индолил масляной кислоты (ИМК), или 2) 4-часовую импульсную обработку в растворе 148,0 мкМ ИМК. После импульсной обработки регенеранты помещали для укоренения либо на АМ0 в условиях *in vitro*, либо высаживали *ex vitro* в смесь торфа (рН 4,0–5,0) и песка в соотношении 1 : 1. Адаптацию укорененных растений проводили в течение шести недель. Растения культивировали под люминесцентными лампами с интенсивностью освещения 27 мкМоль · м⁻² · с⁻¹ при 16-часовом фотопериоде и температуре 23 ± 2 °C. Адаптированные растения пересаживали в горшки диаметром 10 см с почвенной смесью того же состава и переносили в теплицу.

Все эксперименты выполнены в трех повторностях, в каждой повторности использовали 15 эксплантов. Статистическую обработку и анализ полученных данных проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Excel 7.0 и Statistica 8.0. Данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок ($M \pm m$). Для сравнения средних значений независимых выборок использовали многогранговый тест Дункана (однофакторный дисперсионный анализ).

РЕЗУЛЬТАТЫ

*Прорастание семян и введение в культуру *in vitro**

Использованная схема стерилизации позволила получить 87 % стерильных семян. Проклевывание семян *R. yedoense* var. *poukhanense* наблюдали через 4 дня после инокуляции на безгормональную среду. Формирование проростков из семян исследуемого вида отмечено после 10 дней культивирования, причем все проростки имели нормальное строение и окраску (см. рис. 1, а).

Длительность прорастания семян составила 24 дня. Массовая всхожесть семян *R. yedoense* var. *poukhanense* наблюдалась на 13-й день и составила 26,2 % (см. рис. 1, а). Общая всхожесть была на уровне 77,5 % (рис. 1, а, б), энергия прорастания – 26,2 %. Таким образом, семена этого вида можно характеризовать высокой энергией прорастания и всхожестью, что позволяет в короткие сроки получить экспланты для введения в культуру *in vitro* (см. рис. 1, в).

Влияние обработок ТДЗ на морфогенетические реакции проростков

Для минимизации развития аномалий и стимуляции морфогенеза из проростков *R. yedoense* var. *poukhanense* испытывали два способа обработки ТДЗ: культивирование на ТДЗ-содержащей среде и 4-часовая импульсная обработка ТДЗ с последующим культивированием на безгормональной среде. В итоге, максимальный уровень регенерации (100 %) получен при выращивании на АМ, дополненной 1 мкМ ТДЗ, максимальный процент регенерации (93 %) – под действием импульсной обработки 7,5 мкМ ТДЗ (рис. 2). При этом отмечено, что весь спектр использованных обработок и концентраций ТДЗ приводил к формированию как уже сформированных побегов нормального строения (высотой ≥ 5 мм), так и к образованию конгломератов укороченных сросшихся побегов из тканей апикальной почки и гипокотиля (рис. 3, а–в). Выявлено, что наибольшая частота появления таких конгломератов была при культивировании на ТДЗ-содержащей среде (см. рис. 2, 3, в). Под действием импульсной обработки прослеживалась зависимость этого показателя от концентрации ТДЗ: с повышением концентрации ТДЗ процент развития конгломератов увеличивался (см. рис. 2, 3, а, б). При повышении концентрации ТДЗ до 30 мкМ регенеранты представляли собой конгломераты

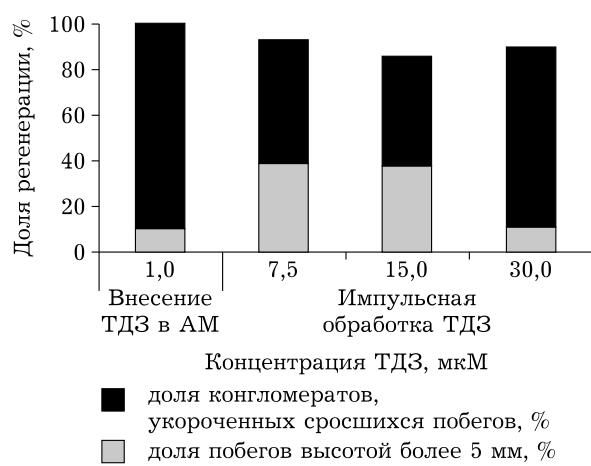


Рис. 2. Влияние различных обработок ТДЗ на регенерацию побегов из проростков *R. yedoense* var. *poukhanense*

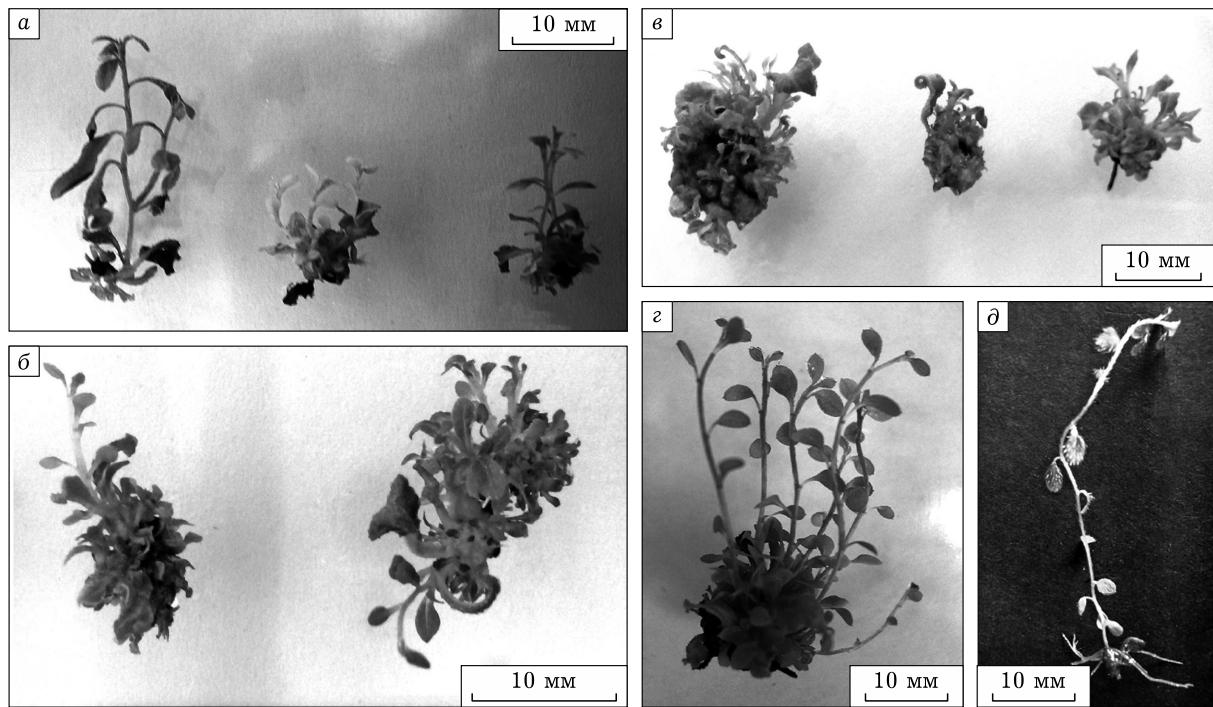


Рис. 3. Морфогенетический ответ *R. yedoense* var. *poukhanense* на различные обработки ТДЗ, последующая элонгация полученных конгломератов и их укоренение *in vitro*: а – регенерация побегов после импульсной обработки 7,5 мкМ ТДЗ на первом пассаже; б – регенерация побегов после импульсной обработки 30 мкМ ТДЗ на первом пассаже; в – регенерация в результате непосредственного культивирования на АМ, дополненной 1,0 мкМ ТДЗ (первый пассаж); г – элонгация побегов на АМ0 (второй пассаж); д – ризогенез под действием импульсной обработки ИМК с последующим культивированием на АМ0

побегов длиной в среднем 10 мм, сросшихся между собой (78,8 %).

Число побегов на экспланте высотой более 5 мм на первом пассаже культивирования не зависело от концентрации ТДЗ при импульсной обработке и достигло минимальных значений при культивировании на ТДЗ-содержащей среде (табл. 1, рис. 3, в). Высота побегов, напротив, существенно зависела от концентрации и типа обработки ТДЗ. Побеги с максимальной высотой были полу-

чены под действием импульсной обработки 7,5 мкМ ТДЗ, при этом с увеличением концентрации ТДЗ этот показатель уменьшался, а при непосредственном культивировании на ТДЗ-содержащей среде достиг минимального значения (см. табл. 1, рис. 3, а, б). Поэтому для элонгации конгломератов укороченных побегов, а также для полной реализации морфогенного потенциала эксплантов использовали дополнительный второй пассаж на безгормональной среде.

Таблица 1
Влияние типов обработки ТДЗ на регенерационный потенциал проростков *R. yedoense* var. *poukhanense*

Тип обработки ТДЗ	Концентрация ТДЗ, мкМ	Число побегов на экспланте*	Высота побегов, мм
Импульсная	7,5	2,82 ± 0,32 ^a	15,03 ± 0,79 ^a
	15,0	1,81 ± 0,28 ^a	11,03 ± 0,56 ^b
	30,0	2,31 ± 0,35 ^a	10,44 ± 0,95 ^b
Внесение в среду	1,0	1,56 ± 0,29 ^b	6,58 ± 0,77 ^c

П р и м е ч а н и е. Данные представлены в виде $M \pm SE$; значения, за которыми следуют одинаковые буквы, не имеют значимых различий при $p = 0,05$ в соответствии с тестом Дункана.

* Учитывали только побеги больше 5 мм.

Элонгация побегов после обработки ТДЗ

Второй пассаж культивирования на безгормональной среде позволил преодолеть аномалии развития у конгломератов побегов, полученных под действием ТДЗ, и существенно увеличить число побегов на экспланте с высотой более 5 мм (табл. 2, рис. 3, г). Этот этап представляет собой элонгацию побегов, полученных после обработки ТДЗ. При этом при непосредственном внесении в питательную среду 1,0 мкМ ТДЗ и после импульсной обработки 30,0 мкМ ТДЗ было получено наибольшее число побегов на экспланте с высотой более 1 см (см. табл. 2). Таким образом, второй пассаж на АМ0 позволяет получить побеги, по морфологическим показателям пригодные для дальнейшего укоренения и адаптации к условиям *ex vitro*. Влияние высоты микропобегов на успех дальнейшего укоренения и адаптации *ex vitro* рододендронов были показаны ранее в работе [Zaytseva, Novikova, 2018].

Укоренение и адаптация к условиям *ex vitro*

Традиционно для укоренения используют либо ИМК, либо индолилуксусной кислоты

(ИУК), однако было показано, что использование ИМК предпочтительнее для эффективного укоренения *in vitro* [Almeida et al., 2005; Филипеня и др., 2009]. В этой связи при инициации ризогенеза *R. yedoense* var. *poukhanense* были испытаны два варианта обработки ауксином: непосредственное культивирование на ИМК-содержащей среде и 4-часовая импульсная обработка этим ауксином в высокой концентрации. Причем предобработанные побеги укореняли либо *in vitro* на АМ, либо *ex vitro* в смеси торфа и песка. В итоге показано, что непосредственное культивирование на ауксин-содержащей среде привело к увяданию побегов, и укоренения не происходило (табл. 3). Импульсная обработка ИМК показала положительные результаты. Максимальный процент укорененных растений (50 %) был получен под действием импульсной обработки с последующим культивированием в условиях *in vitro* на АМ0, при переносе растений для укоренения в условия *ex vitro* частота укоренения снижалась до 13 % (см. табл. 3). Таким образом, способ укоренения *in vitro* после импульсной обработки показал наибольшую эффективность. Однако, в отличие от укорененных *ex vitro* растений, таким растениям требовалась

Т а б л и ц а 2

Эффект дополнительного культивирования на АМ0 на элонгацию ТДЗ-induced укороченных побегов *R. yedoense* var. *poukhanense*

Тип обработки ТДЗ	Концентрация ТДЗ, мкМ	Число побегов на экспланте*	Высота побегов, мм
Импульсная	7,5	5,82 ± 0,81 ^b	11,94 ± 0,56 ^b
	15,0	5,00 ± 0,74 ^b	8,21 ± 0,38 ^d
	30,0	9,32 ± 0,59 ^a	13,76 ± 0,92 ^a
Внесение в среду	1,0	10,32 ± 1,24 ^a	10,01 ± 0,27 ^c

П р и м е ч а н и е. См. табл. 2.

Т а б л и ц а 3

Влияние способов обработки ИМК и условий *in vitro* и *ex vitro* на частоту укоренения и степень развития корневой системы регенерантов *R. yedoense* var. *poukhanense* и *R. schlippenbachii*

Способ обработки	Условие укоренения	Частота укоренения, %	Число корней	Длина корней, см	Длина побегов, см	Число междуузлий
АМ + 10 мкМ ИМК	<i>in vitro</i>	0	0	0	0	0
АМ + 25 мкМ ИМК	<i>in vitro</i>	0	0	0	0	0
Импульсная обработка 30 мг/л ИМК	<i>in vitro</i> (АМ0)	50	4,83 ± 1,22	9,13 ± 2,13	25,67 ± 2,45	8,9 ± 0,59
Импульсная обработка 30 мг/л ИМК	<i>ex vitro</i> (торф : песок)	13,3	4,25 ± 0,63	17,5 ± 2,5	12 ± 1,22	4,25 ± 0,48

дальнейшая постепенная адаптация к нестерильным условиям и пониженной влажности окружающей среды. Поэтому укорененные *in vitro* растения переносили в минипарник, содержащий смесь торфа и песка (в соотношении 1 : 1), и адаптировали к условиям *ex vitro* в течение шести недель, постепенно снижая влажность окружающей среды. Выход адаптированных растений составил 100 %.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе впервые представлена технология клonalного микроразмножения *R. yedoense* var. *poukhanense* из семян для сохранения и быстрого получения посадочного материала, основанная на использовании импульсной обработки ТДЗ в высокой концентрации в качестве триггера морфогенеза. Показано, что семена исследуемого вида обладают высокой всхожестью в условиях *in vitro* и являются надежным источником эксплантов для введения в культуру *in vitro*. Семена – наиболее широко используемый материал для сохранения генетических ресурсов растений в коллекциях культур *in vitro*. При этом в последнее время фокус этой работы смещается в сторону дикорастущих видов, обладающих либо статусами редкости, либо ценными хозяйственными признаками [Еремин и др., 2021]. Использование семян для создания генбанков *in vitro* позволяет сохранить генетическое разнообразие дикорастущих видов, что важно как для решения фундаментальных задач широкого круга наук о растениях, так и для практического применения, например для массового размножения, реинтродукции или для последующей работы с целью увеличения продуктивности и усиления хозяйствственно-ценных признаков [Хлесткина, 2022].

Широко известно, что проростки растений обладают высоким морфогенным потенциалом. Под действием экзогенных регуляторов роста растений можно инициировать широкий спектр морфогенных реакций у проростков: от пролиферации пазушных меристем до морфогенеза *de novo* [Mulwa, Bhalla, 2006; Paul et al., 2011]. При этом для клonalного микроразмножения рододендронов наиболее часто используются пуриновые цитокинины в сочетании с ауксинами [Almeida et al., 2005; Mao

et al., 2011]. Ранее нами была разработана система регенерации из проростков *R. mucronellatum* [Zaytseva, Novikova, 2018], *R. dauricum* [Зайцева, Новикова, 2014] и *R. schlippenbachii* [Зайцева, Новикова, 2015], основанная на индуцирующем действии зеатина. В настоящем исследовании разработан новый подход к инициации регенерации из проростков *R. yedoense* var. *poukhanense* с использованием ТДЗ.

ТДЗ широко используется для инициации широкого круга морфогенных ответов *in vitro*, причем установлено, что наибольшую активность этот регулятор роста показывает в культуре древесных растений [Huetteman, Preece, 1993; Novikova, Zaytseva, 2018]. Действие ТДЗ основано на его способности модулировать уровень эндогенных регуляторов роста в тканях эксплантов, запуская различные программы морфогенеза [Fritzsche et al., 2022]. Однако одним из серьезных недостатков использования этого регулятора роста является появление у регенерантов аномалий развития, таких как гипергидратация, срастание побегов, сильное укорочение междуузлий и угнетение способности к ризогенезу [Dewir et al., 2018]. Для преодоления этих аномалий обычно используют низкие концентрации ТДЗ или дополнительное культивирование на безгормональной среде. Другим подходом к минимизации аномалий развития, вызванных ТДЗ, является использование импульсного воздействия ТДЗ, включающего сокращение времени воздействия на экспланты регуляторов роста [Andrade et al., 2006; Aasim, 2010], сокращая сроки запуска процессов регенерации растительных клеток [Pullman et al., 2003; Andrade et al., 2006]. Эффект импульсной обработки ТДЗ, по всей видимости, связан с быстрым его накоплением и устойчивостью к ферментативному окислению в клетках растения [Murthy et al., 1998; Dey et al., 2012]. Продолжительность импульсной обработки определяется экспериментально и может составлять от нескольких минут до нескольких суток. На примере *Baccharis gasipaes* Kunth. показано, что импульсная обработка 0,36 мкМ ТДЗ в течение 14 дней способствовала росту и развитию побегов, однако сильно ограничивала рост и развитие корней [Graner et al., 2013]. В представленном исследовании впервые показана эффективность использования 4-часовой импульсной обработки проростков

R. yedoense var. poukhanense ТДЗ в высокой концентрации, которая позволила получать побеги нормального строения в достаточном количестве. Похожие результаты были продемонстрированы в культуре *in vitro* *Cicer arietinum* L., где показано, что повышение концентрации ТДЗ до 20 мкМ и снижение времени экспозиции до 12 часов позволило в более короткие сроки получить морфогенный ответ, не снижая при этом качество вновь полученных регенерантов [Kumari et al., 2018]. Кроме того, высокая эффективность импульсной обработки ТДЗ была показана при запуске регенерации из листовых эксплантов у вечноzelеного сорта *R. catawbiense* ‘Grandiflorum’ [Zaytseva et al., 2016] и пазушных побегов из одноузловых эксплантов *R. mucronulatum* [Novikova et al., 2020]. Однако для полной реализации морфогенного потенциала эксплантов *R. yedoense var. poukhanense*, т. е. для увеличения коэффициента размножения, после импульсной обработки необходим дополнительный пассаж на АМ0. При этом для получения регенерантов нормального строения после импульсной обработки ТДЗ листовых эксплантов вечноzelеного сорта *R. catawbiense* ‘Grandiflorum’ [Zaytseva et al., 2016] и одноузловых эксплантов *R. mucronulatum* [Novikova et al., 2020] дополнительного пассажа на безгормональной среде не требовалось. Таким образом, проявляются генотипические различия физиологических реакций различных генотипов рододендронов в культуре *in vitro*.

Несмотря на то что *R. yedoense var. poukhanense* относят к трудно укореняемым видам рода *Rhododendron* [Yoo et al., 2008], разработанная технология позволила получить укорененные и адаптированные микропобеги, развитие которых было индуцировано импульсной обработкой ТДЗ. Таким образом, повышение концентрации при снижении времени воздействия ТДЗ позволило преодолеть аномалии развития побегов *de novo* без угнетения процесса дальнейшего укоренения, сохраняя при этом потенциал стимулирования роста и развития побегов из проростков *R. yedoense var. poukhanense*.

Вклад авторов

Зайцева Ю. Г. осуществляла планирование, реализацию экспериментов, анализ полученных данных, написание и корректировку текста статьи.

Финансирование

Работа выполнена в рамках государственного задания Центрального сибирского ботанического сада СО РАН № АААА-А17-117012610051-5 по проекту “Оценка морфогенетического потенциала популяций растений Северной Азии экспериментальными методами”. В исследовании использован растительный материал из коллекции № УСУ_440534 “Коллекция живых растений в помещении и на открытом воздухе”.

Соблюдение этических стандартов

Представленная работа не содержит каких-либо исследований, связанных с человеком или животными.

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Еремин Г. В., Еремин В. Г., Чепинога И. С., Гасанова Т. А. Особенности сохранения генофонда дикорастущих видов косточковых культур *ex situ* // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2021. Вып. 182, № 3. С. 12–19.
- Зайцева Ю. Г., Новикова Т. И. Клональное микроразмножение *Rhododendron dauricum* // Вестн. Новосибирского гос. ун-та. Серия: Биология, клиническая медицина. 2014. Вып. 12, № 1. С. 26–31.
- Зайцева Ю. Г., Новикова Т. И. Сохранение и размножение *Rhododendron schlippenbachii* с использованием методов биотехнологии // Раst. мир Азиат. России: Вестн. ЦСБС СО РАН. 2015. № 4. С. 79–85.
- Зайцева Ю. Г., Амброс Е. В., Новикова Т. И. Укоренение и адаптация регенерантов морозоустойчивых представителей рода *Rhododendron* к условиям *ex vitro* // Turczaninowia. 2018. Вып. 21, № 1. С. 144–152.
- Филиппеня В. Л., Горбацевич В. И., Антипова Т. В. Микроклональное размножение *Rhododendron × hybridum* hort // Физиология и биохимия культурных растений. 2009. Т. 41, № 6. С. 516–522.
- Хлесткина Е. К. Современные исследования генетических ресурсов растений: в развитие научных школ и научных направлений, основанных при Н.И. Вавилове // Экол. генетика. 2022. Вып. 20, № 3. С. 169–173.
- Aasim M. *In vitro* shoot regeneration of NAA-pulse treated plumular leaf explants of cowpea // Notulae Scientiae Biologicae. 2010. Vol. 2, N 2. P. 60–63.
- Almeida R., Goncalves S., Romano A. *In vitro* micropropagation of endangered *Rhododendron ponticum* L. subsp. *baeticum* (Boissier and Reuter) Handel-Mazzetti // Biodiversity and Conservat. 2005. Vol. 14. P. 1059–1069.
- Anderson W. C. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of rhododendron // J. Am. Soc. Horticult. Sci. 1984. Vol. 109. P. 343.
- Andrade W. F., Almeida M., Gonçalves A. N. Multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus grandis* sob estímulo com benzilaminopurina // Pesq Agrop Brasileira. 2006. Vol. 41. P. 1715–1719.

- Benson E. E. *In vitro* plant recalcitrance: an introduction // In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. 2000. P. 141–148.
- Briggs B. A., McCulloch S. M., Caton L. A. *In vitro* propagation of Rhododendron // Acta Horticulturae. 1994. Vol. 364. P. 21–26.
- Dewir Y. H., Naidoo N. Y., da Silva J. A. T. Thidiazuron-induced abnormalities in plant tissue cultures // Plant Cell Report. 2018. Vol. 37. P. 1451.
- Dey M., Bakshi S., Galiba G., Sahoo L. Development of a genotype independent and transformation amenable regeneration system from shoot apex in rice (*Oryza sativa* spp. *indica*) using TDZ // 3 Biotech. 2012. Vol. 2. P. 233–240.
- Eeckhaut T., Janssens K., Keyser E., Riek J. Micropagation of Rhododendron // Protocols for *in vitro* propagation of ornamental plants: Methods in molecular biology. 2010. Vol. 589. P. 141–152.
- Fritzsche Y., Stefano V. M., Guerra M. P. TDZ induces a dual morphogenetic pathway on leaf explants of the beach huckleberry – *Gaylussacia brasiliensis* // South African J. Bot. 2022. Vol. 145. P. 468.
- Graner E. M., Oberschelp G. P., Brondani G. E., Bata-gin-Piotti K. D., de Almeida C. V., de Almeida M. TDZ pulsing evaluation on the *in vitro* morphogenesis of peach palm // Physiol. Mol. Biol. Plants. 2013. Vol. 19. P. 283–288.
- Huetteman C. A., Preece J. E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1993. Vol. 33. P. 105–119.
- Jung S. J., Kim D. H., Hong Y. H., Lee J. H., Song H. N., Rho Y. D., Baek N. I. Flavonoids from the flower of *Rhododendron yedoense* var. *oukhanense* and their antioxidant activities // Arch. Pharmacal Res. 2007. Vol. 30. P. 146–150.
- Kumari P., Singh S., Yadav S., Tran L. S. P. Pretreatment of seeds with thidiazuron delimits its negative effects on explants and promotes regeneration in chickpea (*Cicer arietinum* L.) // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2018. Vol. 133. P. 103–114.
- Lee S. H., Sancheti S. A., Bafna M. R., Sancheti S. S., Seo S. Y. Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Rhododendron yedoense* var. *Poukhanense* bark // J. M. Plants Res. 2011. Vol. 5. P. 248–254.
- López V., Martín S., Gómez-Serranillos M. P., Carretero M. E., Jäger A. K., Calvo M. I. Neuroprotective and neurological properties of *Melissa officinalis* // Neurochem. Res. 2009. Vol. 34. P. 1955–1961.
- Mao A. A., Kaliamoorthy S., Ranyaphi R. A., Das J., Gupta S., Athili J., Yumnam J. Y., Chanu L. I. *In vitro* micropropagation of three rare, endangered, and endemic rhododendron species of Northeast India // In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. 2011. Vol. 47. P. 674–681.
- Mulwa R. M., Bhalla P. L. *In vitro* plant regeneration from immature cotyledon explants of macadamia (*Macadamia tetraphylla* L. Johnson) // Plant Cell Reports. 2006. Vol. 25. P. 1281–1286.
- Murthy B. N. S., Murch S. J., Saxena P. K. Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis // In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. 1998. Vol. 34. P. 267–275.
- Novikova T. I., Zaytseva Y. G. TDZ-induced morphogenesis pathways in woody plant culture, in Thidiazuron: From Urea Derivative to Plant Growth Regulator / Eds.: N. Ahmad, M. Faisal. Singapore: Springer, 2018. 61 p.
- Novikova T. I., Asbaganov S. V., Ambros E. V., Zaytseva Y. G. TDZ-induced axillary shoot proliferation of *Rhododendron mucronulatum* Turcz. and assessment of clonal fidelity using DNA-based markers and flow cytometry // In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. 2020. Vol. 56. P. 307.
- Paul S., Dam A., Bhattacharyya A., Bandyopadhyay T. K. An efficient regeneration system via direct and indirect somatic embryogenesis for the medicinal tree *Murraya koenigii* // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2011. Vol. 105. P. 271–283.
- Pullman G. S., Johnson S., Peter G., Cairney J. Xu N. Improving loblolly pine somatic embryo maturation: comparison of somatic and zygotic embryo morphology, germination, and gene expression // Plant Cell Rep. 2003. Vol. 21. P. 747–758.
- Yoo B. S., Kim J. Y., Kim Y. C., Lee J. S. Analysis of endogenous hormones associated with hardly rooting Rhododendron species // The Journal of the Korean Society of International Agriculture. 2008. Vol. 20, N 2. P. 107–112.
- Zaytseva Y. G., Novikova T. I. Morpho-histological analysis of shoot regeneration and large-scale propagation of an endangered species *Rhododendron mucronulatum* Turcz. // Siberian Journal of Forestry Science. 2018. Vol. 4. P. 20.
- Zaytseva Y. G., Poluboyarova T. V., Novikova T. I. Effects of thidiazuron on *in vitro* morphogenic response of *Rhododendron sitchense* Pojark. and *Rhododendron catawbiense* cv. Grandiflorum leaf explants // In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. 2016. Vol. 52. P. 56.

In vitro conservation and TDZ-induced micropagation of Rhododendron yedoense var. poukhanense (H. Lév.) Nakai.

YU. G. ZAYTSEVA

*Central Siberian Botanical Garden of SB RAS
101, Zolotodolinskaya st., Novosibirsk, 630090, Russia
E-mail: ulianna_zaitseva@mail.ru*

An effective system of *Rhododendron yedoense* var. *poukhanense* (H. Lév.) Nakai. regeneration from seedling explant based on the use of thidiazuron (TDZ) for meristem proliferation was presented. *In vitro* germinated seedlings were used as explants. The duration of seed germination was 24 days. The total germination of the *R. yedoense* var. *poukhanense* seeds was at the level of 77.5 %. The effects of 4-hour TDZ pulse treatment (7.5; 15.0; 30.0 μ M) with further transferring to Anderson's medium (AM) without TDZ and direct cultivation on AM supplemented with 1.0 μ M TDZ on the morphogenic potential of seedlings were studied. *R. yedoense* var. *poukhanense* regenerants obtained both after pulse treatment and after cultivation on a TDZ-containing medium were found to require an additional passage on hormone-free AM (AM0) for elongation and an increase in the number of shoots per explant. The highest number of shoots per explant was obtained after elongation with direct cultivation on AM with 1.0 μ M TDZ and after 30.0 μ M TDZ pulse treatment, on average 9.32 and 10.32, respectively. The maximum percentage of rooted plants (50 %) was obtained under the action of 4-hour pulse treatment with indolyl butyric acid followed by *in vitro* cultivation on AM0. The presented study demonstrates for the first time the effect of various types of TDZ treatment on the proliferation and development of shoots, and the developed technology made it possible to obtain rooted and acclimatized microshoots induced by TDZ pulse treatment. As a result, *R. yedoense* var. *poukhanense* was included in the *in vitro* collection for conservation and propagation for further practical use.

Key words: *Rhododendron yedoense* var. *poukhanense*, germplasm conservation, *in vitro* seed germination, micropagation, thidiazuron, *in vitro* rooting.