

# Состояние и перспективы биотехнологии в цветоводстве: клональное микроразмножение; создание коллекций *in vitro*; генная инженерия

УДК 57.082.261:582.711.71

## НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ РОЗ

Омар Хуссейнович Заидан<sup>1</sup>, Дарья Александровна Егорова<sup>2</sup>, Любовь Ивановна Бумбеева<sup>2</sup>, Ольга Ивановна Молканова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Российский Государственный Аграрный Университет - МСХА имени К.А. Тимирязева, 127550, Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук, 127276, Россия, г. Москва, Ботаническая ул., 4  
E-mail: molkanova@mail.ru

Работа посвящена усовершенствованию методики клонального микроразмножения ценных сортов роз. Изучены особенности морфогенетических процессов и оптимизированы условия на всех этапах культивирования *in vitro*. Определено влияние различных регуляторов роста на рост и развитие растений-регенерантов *in vitro*. У большинства исследуемых сортов наибольший коэффициент размножения был получен при культивировании на питательных средах, содержащих 1,5 мг/л 6-БАП и 20 мг/л глюкозы. Оптимальной средой для укоренения микропобегов была MS с добавлением 1 мг/л ИУК.

**Ключевые слова:** *Rosa L.*; клональное микроразмножение; регуляторы роста; коэффициент размножения; ризогенез; *in vitro*.

### Введение

Роза (*Rosa L.*) – род семейства розоцветных (Rosaceae), объединяет культурные и дикорастущие формы. Обширный род *Rosa L.* представлен более чем 333 видами и более чем 24 тысячами сортов [1]. Роза – важнейшая декоративно-цветочная культура, а также ценное лекарственное и ароматическое растение [2, 3]. Посадочный материал данной культуры является наиболее востребованными на современном рынке. Потому быстрое получение большого количества саженцев малораспространенных и ценных сортов является актуальным. Традиционный метод размножения роз – черенкование, однако данный метод является довольно трудоемким и не всегда успешным для всех генотипов. Другими ограничивающими факторами в распространении роз являются зависимость от сезона и медленная скорость размножения [4]. Альтернативой черенкованию является метод клонального микроразмножения, высокая эффективность которого уже доказана на примере многих сельскохозяйственных, декоративных и древесных растений [5]. Исключительную ценность этот метод представляет для поддержания биоразнообразия коллекций ботанических садов и сохранения генофонда растений, особенно в тех случаях, когда вид или сорт представлен в единичных экземплярах. Используя технологию размножения *in vitro*, можно получить до 400 000 клонов с одного растения в год. Однако многие представители рода *Rosa L.* характеризуются слабой выживаемостью первичных эксплантов и низким коэффициентом размножения *in vitro* [6].

Цель данного исследования - изучение особенностей регенерации из изолированных апексов разных представителей рода *Rosa* L., выявление благоприятных условий органогенеза на основных этапах клонального микроразмножения.

### Объекты и методы исследования

Исследования выполняли в лаборатории биотехнологии растений ГБС РАН. Исходный материал предоставлен розарием Отдела декоративных растений.

В качестве объектов исследования были взяты перспективные сорта роз следующих садовых групп: шрабы (Hope for Humanity, Morden Centennial), полиантовые (Denise Cassegrain), миниатюрные (Дюймовочка).

Подготовку эксплантов и введение их в культуру *in vitro* производили в стерильных условиях согласно общепринятым рекомендациям [7]. В качестве инициальных эксплантов использовали изолированные апексы размером 0,3-0,6 мм, вычлняемые из латеральных почек, расположенных на различных частях побега.

На этапе собственно микроразмножения использовали питательную среду MS (Murashige and Skoog, 1962) [8], дополненную 6-БАП (6-бензиламинопурин) и 2-ИП (2-изопентил аденин) в концентрациях 0,5; 1,0; 1,5 мг/л. При изучении влияния типа углевода на регенерационный потенциал использовали питательные среды с глюкозой или сахарозой в концентрации 20 мг/л. На стадии ризогенеза в качестве регуляторов роста использовали ИМК (индолил-3-масляная кислота) и ИУК (индолил-3-уксусная кислота) в концентрациях 0,5 и 1,0 мг/л. В качестве контроля использовали среду MS, не содержащую гормональных добавок. Через 20-30 суток проводили учёт следующих показателей: коэффициента размножения и длины побега. В условиях лаборатории микропобеги роз выращивали при освещении (2000 лк) и фотопериоде 16 часов, температуре 23–25 °С и влажности 70 %. Обработку полученных данных проводили по общепринятым методам статистического анализа с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010.

### Результаты и обсуждения

Основными факторами, определяющими процесс органогенеза, являются: эпигенетические характеристики клеток экспланта, физиологическое состояние интактных растений, состав питательной среды и условия культивирования. Степень влияния каждого из названных факторов зависит от генотипа. Компоненты питательной среды, прежде всего регуляторы роста, а также другие условия культивирования изолированных тканей влияют на экспрессию генов, определяющих морфогенез. Для каждого генотипа существуют предел нормы реакции, который изменяется под воздействием экзогенных факторов [9].

В целях оптимизации состава питательной среды на основных этапах клонального микроразмножения было проведено культивирование микропобегов на питательной среде MS, отличающейся регуляторами роста и их концентрацией. При культивировании эксплантов роз для большинства генотипов на питательных средах с 6-БАП и 2-ИП (0,5-1,5 мг/л) через три недели происходит образование от 2 до 14 адвентивных микропобегов в зависимости от сорта. В результате проведенных исследований отмечено, что высота микропобегов исследуемых сортов роз слабо варьировала в зависимости от генотипа (коэффициент вариации составил 28,6%). На коэффициент размножения оказывал влияние генотип растения, регулятор роста и его концентрация. Наиболее оптимальной питательной средой для сортов Hope for Humanity и Morden Centennial оказалась среда, содержащая 1,5 мг/л 6-БАП. Дальнейшее повышение концентрации 6-БАП не способствовало достоверно

значимому увеличению высоты микропобегов и коэффициента размножения, а в некоторых случаях приводило и к снижению показателей роста и к появлению витрофицированных микропобегов, которые в дальнейшем отличались слабой способностью к укоренению. Коэффициент размножения 'Hope for Humanity' составил  $23,7 \pm 1,5$ , 'Morden Centennial' –  $36,4 \pm 2,7$  соответственно (табл.1).

Таблица 1

Влияние типа и концентраций регуляторов роста на коэффициент размножения разных сортов роз

Регулятор роста, мг/л	Коэффициент размножения	
	'Hope for Humanity'	'Morden Centennial'
Контроль	$1,7 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,4$
0,5 2ИП	$4,3 \pm 0,4$	$4,4 \pm 0,6$
1,0 2ИП	$2,3 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,2$
1,5 2ИП	$2,4 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,9$
0,5 6-БАП	$5,8 \pm 0,5$	$9,2 \pm 0,7$
1,0 6-БАП	$14,6 \pm 2,1$	$18,7 \pm 0,6$
1,5 6-БАП	$21,5 \pm 1,4$	$24,3 \pm 1,6$

При исследовании морфогенеза роз на этапе собственно микроразмножения была показана эффективность использования двух методов – индукции множественного побегообразования и микрочеренкования побегов с хорошо развитыми междоузлиями, что позволило значительно повысить коэффициент размножения (рис. 1).



Рис. 1. Микропобеги 'Hope for Humanity' на стадиях инициации (А) и пролиферации (Б)

Для улучшения протоколов микроразмножения некоторых сортов роз применяют различные питательные среды и регуляторы роста, изменяют источники углерода [10]. При культивировании *in vitro* чаще всего в качестве источника углеводного питания используют сахарозу в концентрации 20-40 г/л. В некоторых исследованиях при культивировании представителей родов *Actinidia*, *Clematis*, *Rosa*, *Rubus* положительный эффект был получен при использовании глюкозы [11]. Было изучено влияние источника углевода на показатели роста микропобегов сортов Hope for Humanity, Morden Centennial, Denise Cassegrain и Дюймовочка (рис.2).

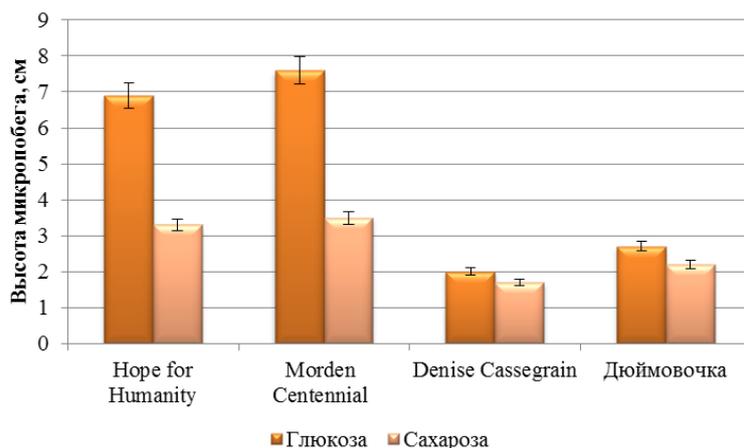


Рис. 2. Влияние типа углевода на высоту микропобегов разных сортов роз

Оценка по такому показателю, как средняя высота микропобега, показала, что изменение углеводного состава среды положительно влияет на силу роста микропобегов сорта Hope for Humanity и Morden Centennial, относящимся к канадским шрабам. В случае сортов Denise Cassegrain и Дюймовочка не показано существенного увеличения длины микропобега, что может быть связано с особенностями групп, к которым относятся данные сорта. Использование в качестве источника углеводного питания глюкозы существенно влияло на повышение коэффициента размножения сортов всех сортов роз. Канадский шраб Morden Centennial характеризовался наибольшей отзывчивостью на изменение типа углевода (рис.3).

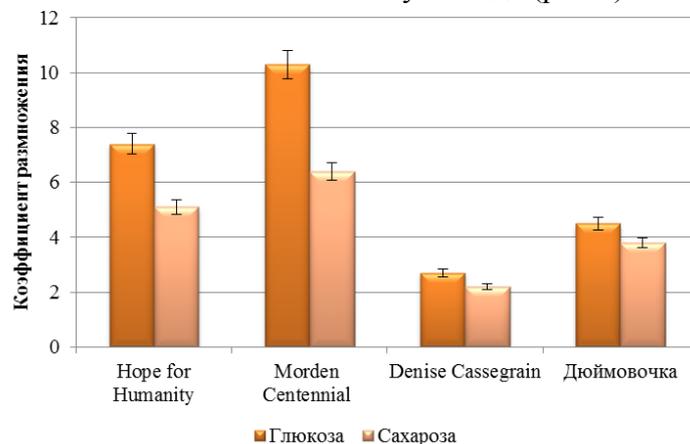


Рис. 3. Влияние типа углевода на коэффициент размножения разных сортов роз

Известно, что развитие корневой системы в культуре *in vitro* определяется, в первую очередь, генотипом и поддается управлению с помощью химических факторов лишь в определенных пределах. Укоренение роз зависит от сорта, и у некоторых видов достигается практически 100% укоренение микропобегов [12, 13]. Наши исследования показали, что укоренение микропобегов роз *in vitro* зависит не только от состава питательной среды, но и от сортовых особенностей. При культивировании сорта Hope for Humanity наблюдали увеличение количества укоренившихся микропобегов при увеличении концентрации ИМК и ИУК. При этом лучший результат укоренения достигался на среде с добавлением 0,5-1,0 мг/л ИУК. Сорт Morden Centennial лучше укоренялся на среде с добавлением 1 мг/л ИУК (рис. 4).

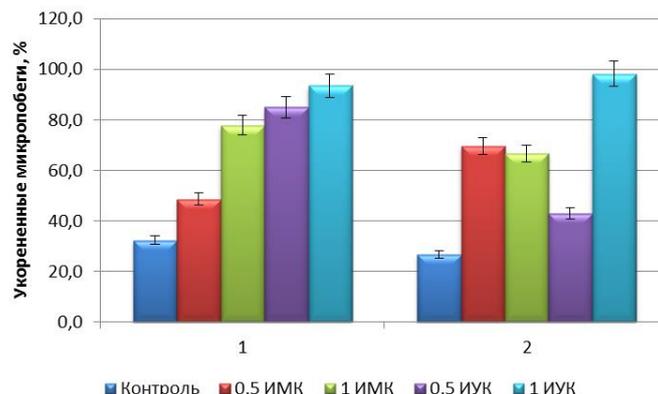


Рис. 4. Влияние типа и концентраций ауксина на укоренение микропобегов роз сортов: Hope for Humanity (1); Morden Centennial (2)

Наибольшее количество корней у обоих сортов наблюдали на питательной среде, содержащей 1 мг/л ИУК. Однако сорт Morden Centennial образовывал больше корней и отличался более интенсивным развитием микропобегов (рис. 5).

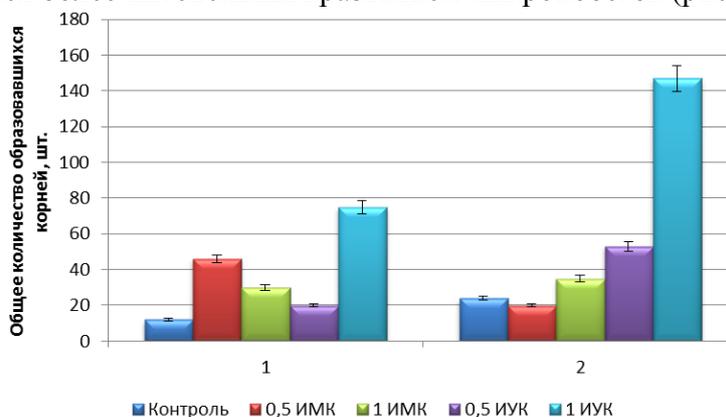


Рис. 5. Влияние типа и концентраций ауксина на общее количество образовавшихся корней роз сорта: 1 - Hope for Humanity; 2 - Morden Centennial

Наиболее оптимальным регулятором роста для укоренения сортов Hope for Humanity и Morden Centennial оказался ИУК в концентрации 1 мг/л: все изученные сорта проявили высокую способность к укоренению на среде с данным ауксином; первые корни появлялись уже спустя 15 суток культивирования; при всех испытанных концентрациях ИУК не отмечали появление каллуса на базальной части микрочеренков; формировалась более развитая корневая система.

### Выводы

В процессе работы с различными сортами роз выявлено, что на регенераторную способность в культуре изолированных тканей существенное влияние оказывают генетические особенности: наибольшим морфогенетическим потенциалом характеризовался сорт Morden Centennial, относящийся к группе шрабов. Регенерируемые растения представителей рода *Rosa* L. отличались по своей реакции на содержание 6-БАП, 2-ИП и источников углевода в питательной среде. Модифицирован протокол клонального микроразмножения. На стадии пролиферации целесообразно использовать питательную среду MS с добавлением 1,5 мг/л 6-БАП и 20 мг/л глюкозы, на стадии укоренения – ИУК в концентрации 1 мг/л.

## Список литературы

1. Бумбеева Л. И. Розы. – М.: Кладезь – Букс, 2010 – 256 с.
2. Maurya R.P., Yadav R.C., Godara N.R., Beniwal V.S. *In vitro* plant regeneration of rose (*Rosa hybrida* L.) cv. «Benjamin Paul» through various explants // Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences – 2013. – Vol. 1 (2S). – P. 111 – 119.
3. Сиденко Т. И., Митрофанова И. В. Особенности введения в культуру *in vitro* некоторых сортов садовой группы миниатюрных роз // Бюл. Гос. Никитского бот. сада. – 2011. – № 133. – С. 41– 53.
4. Pati P.K, Rath S.P, Sharma M., Sood A., Ahuja P.S. *In vitro* propagation of rose – a review // Biotechnology Advances. – 2006. – №24. – P. 94 – 114.
5. Бутенко Р.Г. Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. – М.: Наука, 1991. – 279 с.
6. Martin C. Plant breeding *in vitro* // Endeavour New Series. – 1985. – №9. – P. 81 – 84.
7. Шевелуха В.С., Калашиникова Е.А., Кочиева Е.З. и др. Сельскохозяйственная биотехнология – М.: Высш. шк., 2008. – 710 с.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V.15, №13. – P.473 – 497.
9. Молканова О.И., Васильева О.Г., Коновалова Л.Н. Научные основы сохранения и воспроизводства генофонда ценных и редких видов растений в культуре *in vitro*// Бюлл. Гл. ботан. сада. – 2005. – № 2 (201). – С. 78– 82.
10. Senapati S.K., Rout G.R. Study of culture conditions for improved micropropagation of hybrid rose // Hort. Sci. – 2008. – №35. – 27–34.
11. Молканова О.И., Коновалова Л.Н., Стахеева Т.С. Формирование генетического банка *in vitro* плодовых и ягодных культур в ГБС РАН// Плодоводство и ягодоводство России. – 2016. – Том: XXXXIV. – С. 197– 200.
12. Пронина И.Н., Матушкина О.В. Особенности регенерации сортов малины и ежевики *in vitro* // Плодоводство и ягодоводство России. – 2009. – Т. 22. – № 2. – С. 206 – 210.
13. Horn W.A.H. Micropropagation of rose (*Rosa* L.) // Biotechnology in agriculture and forestry. 1992. – Vol. 20. – P. 320 – 342.

Zaidan O.H., Egororva D.A., Bumbeeva L.I., Molkanova O.I. Some aspects of clonal micropropagation of various rose varieties // Works of the State Nikit. Botan. Gard. – 2017. – V. 145 – P. 162-167.

The work is devoted to improvement of clonal micropropagation techniques for valuable cultivars of roses. The features of morphogenetic processes are studied and the conditions of *in vitro* cultivation at all stages are optimized. The influence of various growth regulators on the growth and development of plant *regenerants in vitro* was determined. The highest multiplication factor of the majority studied varieties was obtained by culturing on culture media containing 1.5 mg/l 6-BAP and 20 mg/l glucose. The optimum medium for microshoots rooting was MS with 1 mg/l IAA.

**Keywords:** *Rosa* L.; *in vitro*; growth regulators; coefficient of reproduction; rhizogenesis.