

Глава 4.

**БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ**

УДК 57.082.261:582.711.71

doi: 10.31360/2225-3068-2020-74-85-92

**ОСОБЕННОСТИ КЛОНАЛЬНОГО  
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ РОЗ СОРТОГРУППЫ  
МИНИАТЮРНЫЕ (MIN) И ЧАЙНО-ГИБРИДНЫЕ  
(HT & CL HT)**

**Малаева Е. В.** <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Государственное бюджетное учреждение Волгоградской области  
«Волгоградский региональный ботанический сад»

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО  
«Волгоградский государственный социально-педагогический университет»

г. Волгоград, Россия, e-mail: e.malaeva@mail.ru

Работа посвящена усовершенствованию методики клонального микро-размножения ценных сортов роз сортогруппы миниатюрные (Min) и чайно-гибридные (HT & Cl HT). 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 0,5 мг/л 6-БАП. Оптимальной средой для укоренения микропобегов была МС с добавлением 0,5 мг/л ИУК.

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

Роза и её декоративные сорта являются важной мировой цветочной культурой. Род *Rosa L.* принадлежит к семейству *Rosaceae* и включает в себя сотни видов и более 30 тысяч сортов [1].

Основой современной классификации садовых роз является не происхождение, а декоративные и биологические признаки. В 1967 г. Американским обществом розоводов (The American Rose Society) была создана классификация роз. Затем классификацию утвердила Всемирная Федерация общества розоводов (The World Federation of Rose Societies). Последнюю версию измененной классификации опубликовали в 2000 г. в 'Modern Roses' XI (The World Encyclopedia of Roses. Academic Press) [9].

Коллекция роз ГБУ ВО 'Волгоградский региональный ботанический сад' (ГБУ ВО 'ВРБС') насчитывает 150 сортов из восьми сортогрупп.

Одним из эффективных способов получения корнесобственных саженцев роз является метод микроклонального размножения – получение *in vitro* растений, генетически идентичных исходному экспланту. Освоение технологии размножения розы *in vitro* имеет большое значение в создании высококачественного посадочного материала. Быстрое размножение и производство безвирусных растений *in vitro* сыграли важнейшую роль в распространении коммерческих сортов розы садовой. Этот метод является крайне важным для поддержания биоразнообразия коллекций ботанических садов и сохранения генофонда растений, особенно если вид или сорт представлен в единичных экземплярах. Таким образом, оптимизация технологии клонального микро-размножения роз является крайне актуальной задачей.

**Объекты и методы.** Работа по изучению клонального микро-размножения садовых роз в культуре *in vitro* осуществлялась в течение 2018–2020 г. на базе лаборатории ГБУ ВО ‘ВРБС’. Объектами исследования служили сорта роз следующих сортогрупп:

1. миниатюрные (Min): ‘Lavender Meilandina’, ‘Baby Masquerade’, ‘Orange Symphonie’;
2. чайно-гибридные (HT & Cl HT): ‘Madonna’, ‘Pullman Orient Express’, ‘Cuthebert Grant’, ‘Traviata’, ‘Kronenbourg’, ‘Monica’, ‘Louis de Funes’.

Для получения растений-регенератов использовали верхушки молодых побегов (апексы) и сегмент побега с пазушными почками. В основу методики работы с культурой изолированных тканей и органов садовых роз легли классические работы по культуре клеток и тканей растений [2, 4].

Первичные экспланты после поверхностной стерилизации и промывки помещались на поверхность гормональной агаризированной среды Мурасиге-Скуга (1962) [10].

В качестве стерилизующих агентов использовали раствор «Лизоформина 3000» (действующее вещество – глутаровый альдегид, глиоксаль и дидецилдиметиламмоний хлорид) и «Белизну» (бытовое отбеливающее средство на основе гипохлорита натрия) с различными режимами стерилизации: 10%-ная белизна – 7 мин; 20%-ная белизна – 5 мин; 3%-ный лизоформин – 3 мин; 5%-ный лизоформин – 5 мин.

При анализе эффективности приёмов стерилизации мы учитывали количество стерильных и нежизнеспособных эксплантов. Все этапы проводились в условиях абсолютной асептики.

Правильный выбор стерилизующего вещества заключается в том, чтобы нейтрализовать эпифитную микрофлору и не повредить ткань растения. Кроме этого, вещество не должно проникать в ткань и легко смываться. После отделения от цельного растения черенки тщательно

отмывались с помощью моющих средств и в течение 1–1,5 часа находились под проточной водой.

В экспериментах по микроразмножению садовых роз использовали следующие прописи питательных сред:

1. МС + 6-БАП (6-бензиламинопурин) 0,5 мг/л;
2. МС+ ЦФ (цитодеф) 0,5 мг/л;
3. МС + ЦФ (цитодеф) 1 мг/л;
4. МС + ЦФ (цитодеф) 0,5 мг/л + ИУК (в-индолилуксусная кислота) 0,01 мг/л;
5. МС + 6-БАП (6-бензиламинопурин) 0,1 мг/л + ИУК ИУК (в-индолилуксусная кислота) 0,01 мг/л;

В качестве индукторов ризогенеза использовали следующие ауксины: в-индолилуксусная кислота (ИУК), в-индолилмасляная кислота (ИМК) и б-нафтилуксусная кислота (НУК) в концентрации 0,5–1 мг/л.

Растения культивировали при  $t = 24 \pm 2$  °С, освещённостью 2 500–5 000 люкс при 16-часовом фотопериоде. Все опыты проводились в трёхкратной повторности по 20 эксплантов в каждом варианте. Результаты экспериментальных данных обрабатывались статистически с помощью компьютерной программы Excel лицензионного пакета Microsoft Office 2007. Полученные данные достоверны при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Реализация морфогенетического потенциала культивируемых растений обусловлена видовыми особенностями, типом и сроками изоляции экспланта, составом питательной среды, условиями культивирования и режимом стерилизации при введении в культуру. Именно подбор оптимального режима стерилизации имеет решающее значение для дальнейшего введения роз в культуру *in vitro* (табл. 1).

В результате проведённых исследований установлено влияние типа стерилизующего агента, его концентрации и генотипа на жизнеспособность эксплантов сортов садовых роз. Так, при стерилизации *R. × hybrida* ‘Pullman Orient Express’, ‘Lavender Meillandina’, ‘Baby Masquerade’, ‘Orange Symphonie’, ‘Traviata’ и ‘Kronenbourg’ выход жизнеспособных эксплантов был выше при использовании 5%-ного лизоформина, время экспозиции 5 минут. При этом выход жизнеспособных эксплантов в среднем составил от 50 % для сортов ‘Madonna’ и ‘Cuthbert Grant’ до 90 % – ‘Lavender Meillandina’, ‘Louis de Funes’ и ‘Kronenbourg’. Наименьший выход жизнеспособных эксплантов наблюдали при использовании 10%-ной белизны, время экспозиции 7 минут. При использовании данного режима стерилизации выход жизнеспособных эксплантов составил 20 % для сортов ‘Lavender Meillandina’, ‘Madonna’, ‘Pullman Orient Express’ и ‘Kronenbourg’.

**Влияние режимов стерилизации  
на жизнеспособность эксплантов садовых роз**

| № п/п | Название сорта           | Выход жизнеспособных эксплантов, % |                       |                         |                         |
|-------|--------------------------|------------------------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
|       |                          | 10%-ная белизна 7 мин              | 20%-ная белизна 5 мин | 3%-ный лизоформин 3 мин | 5%-ный лизоформин 5 мин |
| 1     | ‘Lavender Meilandina’    | 20 %                               | 70 %                  | 40%                     | 90 %                    |
| 2     | ‘Baby Masquerade’        | 40 %                               | 60 %                  | 30 %                    | 80 %                    |
| 3     | ‘Orange Symphonie’       | 40 %                               | 50 %                  | 30 %                    | 70 %                    |
| 4     | ‘Madonna’                | 20 %                               | 50 %                  | 20 %                    | 50 %                    |
| 5     | ‘Cuthbert Grant’         | 40 %                               | 40 %                  | 50 %                    | 50 %                    |
| 6     | ‘Pullman Orient Express’ | 20 %                               | 40 %                  | 40 %                    | 60 %                    |
| 7     | ‘Monica’                 | 40 %                               | 60 %                  | 30 %                    | 60 %                    |
| 8     | ‘Traviata’               | 30 %                               | 40 %                  | 50 %                    | 70 %                    |
| 9     | ‘Louis de Funes’         | 40 %                               | 90 %                  | 30 %                    | 90 %                    |
| 10    | ‘Kronenbourg’            | 20 %                               | 70 %                  | 40 %                    | 90 %                    |

Таким образом, оптимальным режимом стерилизации исследованных миниатюрных сортов роз является 5%-ный лизоформин, при этом время экспозиции составило 5 минут. Для чайно-гибридных роз – 5%-ный лизоформин и 20%-ная белизна.

На этапе введения в культуру *in vitro* использовали МС, содержащую 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л.

В своем эксперименте на предварительном этапе работы, с целью подбора оптимального сочетания гормонов, было использовано 5 вариантов питательной среды с различными комбинациями. Контролем являлась среда МС без гормонов.

При культивировании сортов роз на питательной среде, содержащей 0,5 мг/л БАП, был получен максимальный коэффициент размножения для всех исследованных сортов. Максимальный коэффициент размножения наблюдали у сортов миниатюрных роз ‘Baby Masquerade’, ‘Orange Symphonie’ –  $18 \pm 0,6$  микропобегов/эксплант. (рис. 1).

В ходе исследования установлено, что коэффициент размножения зависел не только от используемого цитокинина, но и от сортогруппы роз. Так, на питательной среде МС, содержащей 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л коэффициент размножения миниатюрных роз в среднем составил 16 микропобегов/эксплант, для чайно-гибридных – 7,4 (рис. 1).

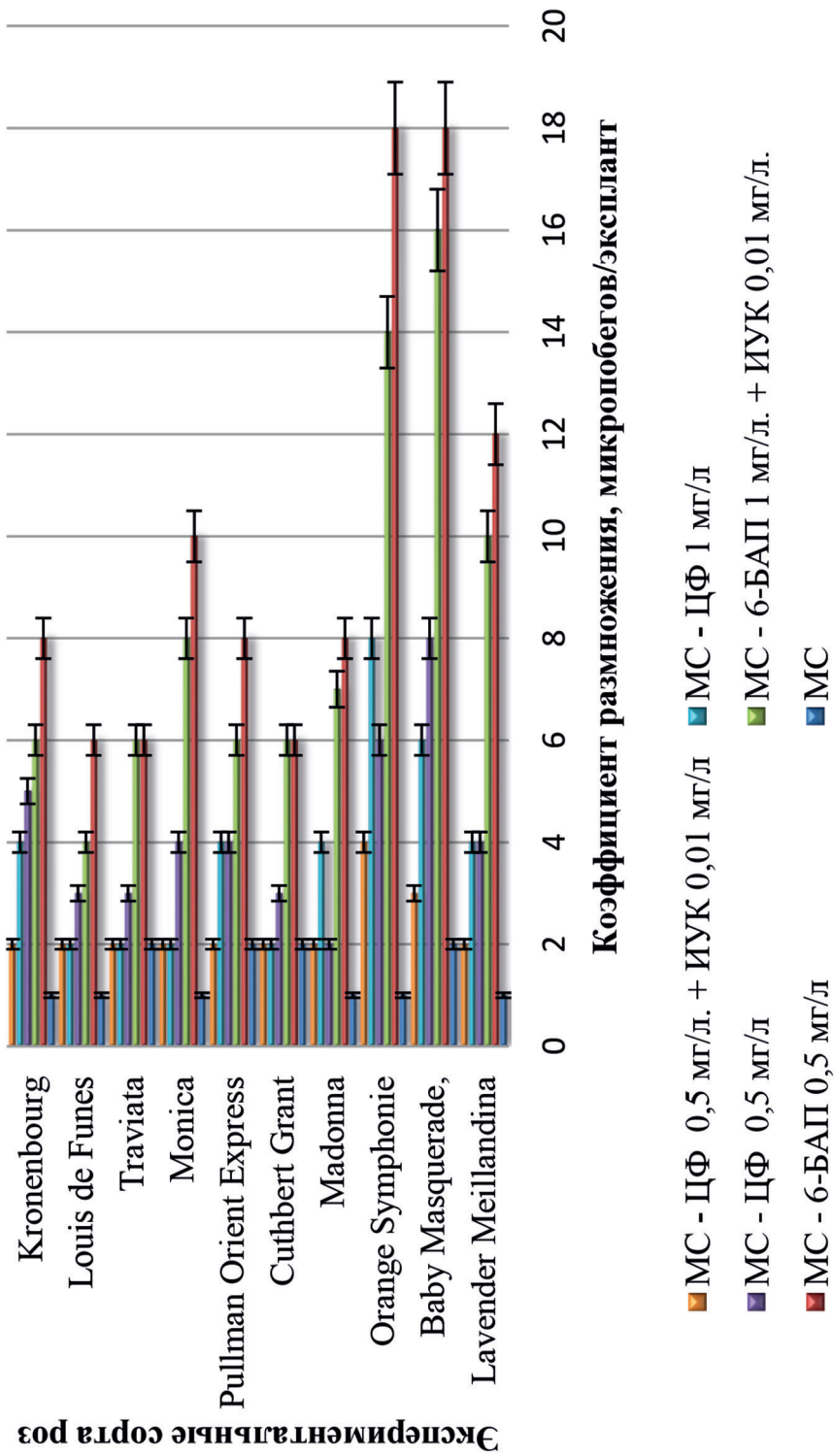


Рис. 1. Влияние различных модификаций питательной среды на коэффициент размножения розы садовой

На питательных средах МС – 6-БАП 1 мг/л + ИУК 0,01 мг/л и МС – ЦФ 0,5 мг/л + ИУК 0,01 мг/л наблюдали спонтанное образование корней у всех исследованных сортов роз. Данная модификация питательной среды может использоваться на этапе микроразмножения, минуя этап укоренения *in vitro*. Таким образом, использование данной схемы позволит значительно снизить себестоимость адаптированных растений-регенератов.

Побеги разных культур специфично реагируют на тип ауксина и его концентрацию. Чаще всего используют концентрацию ауксинов в пределах 0,5–5,0 мг/л [3, 7, 8]. Установлено, что добавление ИУК в концентрации 0,5 мг/л в питательную среду способствует наиболее интенсивному образованию корней. По такому показателю, как количество корней, оптимальным является использование ИУК в концентрации 0,5 мг/л по сравнению с ИМК (табл. 2).

Таблица 2

**Влияние ауксинов на индукцию ризогенеза  
микрочеренков представителей розы садовой**

| № п/п | Название сорта   | Количество корней, шт. |              |              |              |              |
|-------|------------------|------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|       |                  | MS (контроль)          | ИУК 0,5 мг/л | ИУК 1,0 мг/л | ИМК 0,5 мг/л | ИМК 1,0 мг/л |
| 1     | ‘Madonna’        | –                      | 9 ±0,3       | 4 ±0,2       | 4 ±0,3       | 3 ±0,2       |
| 2     | ‘Cuthbert Grant’ | –                      | 8 ±0,1       | 6 ±0,04      | 5 ±0,2       | 2 ±0,1       |
| 3     | ‘Monica’         | –                      | 7 ±0,1       | 3 ±0,5       | 5 ±0,03      | 4 ±0,3       |
| 4     | ‘Traviata’       | –                      | 6 ±0,2       | 4 ±0,3       | 4 ±0,05      | 2 ±0,4       |
| 5     | ‘Louis de Funes’ | –                      | 9 ±0,3       | 5 ±0,4       | 4 ±0,3       | 2 ±0,3       |

Таким образом, оптимальной питательной средой на этапе укоренения является среда МС с полным составом макро- и микросолей с добавлением ИУК в концентрации 0,5 мг/л. При использовании ИУК в концентрации 0,5 мг/л количество корней было максимальным для всех сортов, но наибольшее их количество 9 ±0,3 отмечено у сортов ‘Madonna’ и ‘Louis de Funes’.

По нашему мнению, наиболее ответственным моментом при клональном микроразмножении является перевод растений из асептической культуры в нестерильные условия. Выход адаптированных растений при использовании разработанной ранее методики составил 70–95 % [5, 6].

В качестве субстрата используется смесь торфа, песка и вермикулита в соотношении 1 : 1 : 1. Для лучшей адаптации растений к условиям

*in vivo* в первые две недели необходимо поддерживать относительную влажность 75–80 %. Это можно обеспечить, создав условия «влажной камеры» с ежедневным кратковременным проветриванием. Для этого растения-регенеранты розы высаживали в пластиковые стаканчики, заполненные на 1/3 почвенной смесью.

После посадки растения увлажняли и заматывали пленкой. Через неделю в пленке делали перфорации, чтобы процесс адаптации к нестерильным условиям происходил постепенно. Температура должна быть не ниже 20 °С и не выше 25 °С, т. к. при снижении температуры наблюдается замедление темпов роста. Необходимо обеспечивать повышенную освещённость растений.

Через 2 месяца после адаптации растения можно переносить в открытый грунт для доращивания.

**Выводы.** В результате проведённых исследований установлено влияние типа стерилизующего агента, его концентрации и генотипа на жизнеспособность эксплантов сортов садовых роз.

В ходе исследования установлено, что коэффициент размножения зависел не только от используемого цитокинина, но и от сортогруппы розы. Так, на питательной среде МС, содержащей 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л, коэффициент размножения миниатюрных роз в среднем составил 16 микропобегов/эксплант, для чайно-гибридных – 7,4.

Оптимальной питательной средой на этапе укоренения является среда МС с полным составом макро- и микросолей с добавлением ИУК в концентрации 0,5 мг/л.

#### Библиографический список

1. Бумбеева Л.И. Розы. – М.: Кладезь-Букс, 2010. – 256 с.
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
3. Заидан О.Х., Егорова Д.А., Бумбеева Л.И., Молканова О.И. Некоторые аспекты клонального микроразмножения различных сортов роз // Сборник научных трудов ГНБС, 2017. – Т. 145. – С. 162-167. – ISSN 0201-7997.
4. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроклонального размножения растений. – Киев: Наукова думка, 1992. – 488 с.
5. Крахмалева И.Л., Молканова О.И., Малаева Е.В. Использование клонального микроразмножения для разных форм перспективных сортов *Actinidia kolomikta* (Rupr. et Maxim) Maxim // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада, 2019. – Вып. 133. – С. 80-86. – ISSN 0513-1634.
6. Малаева Е.В., Молканова О.И. Биотехнологические и экономические аспекты клонального микроразмножения ремонтантной малины // Плодоводство и ягодоводство России. – 2017. – Т.48. – С. 183-189. – ISSN 2073-4948.
7. Самарская В.О., Малаева Е.В., Постнова М.В. Аспекты клонального микроразмножения и сохранения растений *in vitro* // Природные системы и ресурсы. – 2019. – Т. 9. – № 3. – С. 13-22.



8. Сиденко Т.И., Митрофанова И.В. Особенности введения в культуру *in vitro* некоторых сортов садовой группы миниатюрных роз // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. – 2011. – № 133. – С. 41-53. – ISSN 0513-1634.
9. Modern Roses XI. The World Encyclopedia of Roses. – Academic Press, 2000.
10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Phsiol. plant. – 1962. – Vol. 15. – № 3. – P. 473-497.

### SPECIFICS OF CLONAL MICROPROPAGATION OF MINIATURE (MIN) AND HYBRID TEA (HT & CL HT) ROSE CULTIVAR GROUPS

**Malayeva Ye. V.** <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> State Budgetary Institution of Volgograd region  
“Volgograd Regional Botanical Garden”

<sup>2</sup> Volgograd State Social & Pedagogical University

Volgograd, Russia, e.malaeva@mail.ru

The work is devoted to improvement of clonal micropropagation techniques for valuable rose cultivars – miniature (Min) and hybrid tea (HT & Cl HT). The specifics 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 of studied cultivars was obtained by culturing on culture media containing 0,5 mg/l 6-BAP. The optimum medium for microshoots rooting was MS with 0,5 mg/l IAA.

**Key words:** clonal micropropagation, coefficient of reproduction, growth regulators, rhizogenesis, *in vitro*, *Rosa* L.

УДК 581.1

doi: 10.31360/2225-3068-2020-74-92-99

### ТРАНСГЕННЫЕ РАСТЕНИЯ: ФУНДАМЕНТАЛЬНОЕ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

**Цыпурская Е. В., Загоскина Н. В.**

*Институт физиологии растений  
им. К.А. Тимирязева Российской академии наук,  
г. Москва, Россия, e-mail: elena-pr22@mail.ru*

Трансгенные растения, полученные с использованием методов генной инженерии, представляют собой уникальные биотехнологические объекты для фундаментального и практического применения. В различных лабораториях мира создают трансгенные культуры с генами, связанными с устойчивостью к насекомым, вирусам, грибным и бактериальным патогенам, гербицидам и