

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ПЕРСПЕКТИВНЫХ СОРТОВ РОЗ РАЗЛИЧНЫХ САДОВЫХ ГРУПП ДЛЯ СОЗДАНИЯ РАСТУЩИХ КОЛЛЕКЦИЙ

*О.П. МОВЧАН,
И.В. МИТРОФАНОВА, кандидат биологических наук;
З.К. КЛИМЕНКО, доктор биологических наук;
В.Д. РАБОТЯГОВ, доктор биологических наук*

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

Введение

Садовая роза широко используется в озеленении и занимает одно из ведущих мест в декоративном садоводстве. В Никитском ботаническом саду имеется богатейшая коллекция садовых роз [2].

Генетическим ресурсам растений постоянно угрожают неблагоприятные экологические факторы, поэтому сохранение генофонда является актуальной проблемой, и современные биотехнологические методы позволяют решать её более эффективно, чем это предлагают традиционные методы сохранения [3, 5].

Многолетние исследования, проводимые в отделе биотехнологии и биохимии растений НБС, показали, что наиболее доступным и экономически оправданным способом долговременного хранения коллекции генотипов, необходимым в особенности для безвирусных сортов, является депонирование вегетативных почек и побегов киви, зизифуса, клематиса и розы *in vitro* при низких положительных температурах (растущие коллекции растений) [4].

Целью нашей работы было изучение условий введения вегетативных почек в условиях *in vitro* и индукция побегообразования перспективных сортов роз 9 садовых групп для последующей их закладки на длительное холодное хранение.

Материалы и методы

Для выявления влияния генотипа на морфогенетические потенции эксплантов розы, планируемых для длительного хранения *in vitro*, использовали 18 сортов коллекционного генофонда НБС, представленных 9 садовыми группами: Рулети, Цвергкенинг (Миниатюрные); Дольче Вита, Конрад Хенкель, Климентина (Чайно-гибридные); Коралловый Сюрприз (Грандифлора); Аджимушкай, Нью Доун, Симпатияи (Плетистые крупноцветные); роза Брактеата (Плетистые); Херсонес, Казино (Шраб); Джордж Диксон, Капитан Хейуорд (Ремонтантные); Айсберг, Пусста, Шокинг Блю (Флорибунда); Леди Ридинг (Полиантовые).

Исходные экспланты отбирались в различные фазы вегетации растений. Для введения *in vitro* среднюю и нижнюю части побегов розы нарезали на сегменты с одной почкой. Экспланты последовательно стерилизовали 40-60 сек в 70%-м этиловом спирте с добавлением 1 капли детергента Tween 80 и погружали на 20 мин в 1% Thimerosal с последующей 3-кратной промывкой стерильной дистиллированной водой; затем помещали в 0,08% раствор AgNO₃ и 4-кратно промывали стерильной дистиллированной водой.

В качестве первичных эксплантов использовали меристематические ткани и почки с микрощитком, которые в асептических условиях помещали на питательную среду. В качестве базовой была использована агаризованная среда МС [6], на основе которой в отделе биотехнологии и биохимии растений разработаны 3 состава сред для каждого этапа морфогенеза. На I этапе культивирования использовали два варианта модифицированной среды Ra: с добавлением 1 мг/л аскорбиновой кислоты и с добавлением 1 г/л активированного угля. Эти вещества вводили в питательную среду в качестве ингибиторов образования фенольных соединений. На II этапе культивирования использовали среду Rb, поддерживающую рост микропобегов, на III этапе - среду Ry для укоренения микропобегов.

Для индукции развития пазушных меристем использовали цитокинин 6-бензиламинопурин (БАП) в концентрации 0,1-2,0 мг/л. Культивирование на всех этапах морфогенеза осуществляли в климатической камере при 16-часовом фотопериоде, температуре

22-25°C и интенсивности освещения 2-3 клк (лампы ЛДЦ-80).

Результаты и обсуждение

Серия экспериментов по получению асептических эксплантов показала, что наиболее эффективным оказался метод ступенчатой стерилизации. Процент инфицированных эксплантов от общего количества, введенных в условия *in vitro* составил 4,4%, следовательно, процент свободных от контаминации эксплантов - 96,6% (табл.1).

Таблица 1

Результаты стерилизации почек исследуемых сортов розы садовой

Сорт	Количество эксплантов, %		
	инфицированных	потемневших	жизнеспособных
Роза Брактеата	0	100	0
Климентина	0	0	100
Дольче Вита	0	0	100
Конрад Хенкель	0	0	100
Нью Доун	0	0	100
Аджимушкай	0	0	100
Симпатия	0	0	100
Коралловый Сюрприз	0	0	100
Леди Ридинг	0	0	100
Казино	0	0	100
Херсонес	11,1	0	89,9
Пусста	0	0	100
Шокинг Блю	0	0	100
Айсберг	61,5	0	49,5
Рулети	0	0	100
Цвергкениг	0	0	100
Джордж Диксон	28,5	0	72,5
Капитан Хейворд	0	0	100

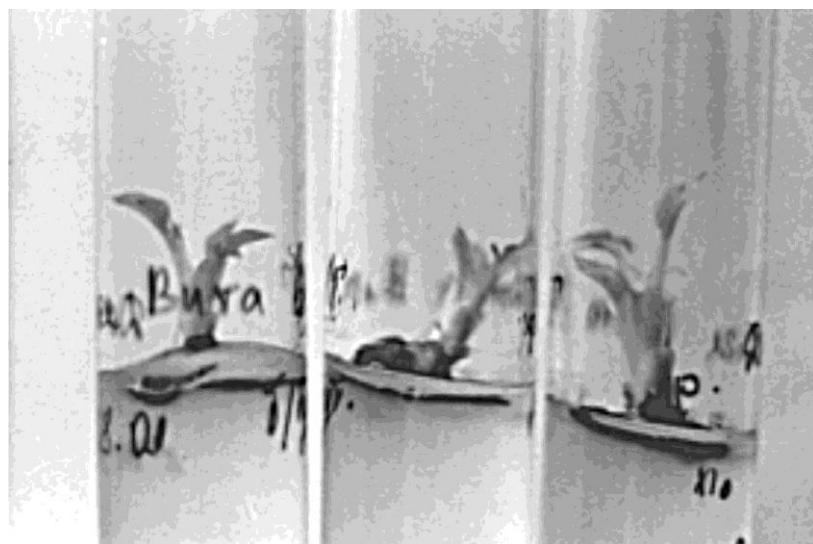
Высокую приживаемость отмечали у эксплантов, почки для которых отбирали с одревесневших однолетних или с побегов текущего года. При введении в культуру *in vitro* сорта Роза Брактеата на 2-е сутки культивирования наблюдали появление в питательной среде фенольных соединений, которые задерживали развитие почек. В период с августа по октябрь было проведено 3 пассажа вегетативных почек на свежеприготовленную питательную среду (1 раз за 14 суток), но развития эксплантов не отмечали. Наши исследования показали, что оптимальным сроком отбора первичных эксплантов для роз групп флорибунда и чайно-гибридных является период окрашивания бутонов. Эти результаты полностью совпали с результатами экспериментов, проводившихся на протяжении многих лет в отделе биотехнологии [1]. Первичные экспланты для введения в культуру *in vitro* роз садовых групп шраб, грандифлора, полиантовых, миниатюрных и ремонтантных также отбирали в период окрашивания бутонов и, дополнительного, в период цветения. Однако, почки, взятые в период цветения, обычно были полураскрытыми и повреждались во время стерилизации.

У сортов чайно-гибридной группы Климентина, Конрад Хенкель и Дольче Вита почки на материнском растении были достаточно крупными, и начало их развития наблюдали на 4-5 сутки после введения (рис.).

В культуре *in vitro* после 14 суток культивирования у эксплантов сорта Климентина образовались по 2-3 полноценных боковых побега.

Следует отметить, что экспланты сортов Казино и Херсонес садовой группы шраб начинали развиваться на 2-3 сутки после введения, при этом фенольные соединения выделялись в питательную среду на 3-4 сутки, что на 1-2 суток раньше, чем у других сортов. Микропобеги исследуемых сортов были достаточно сильными и образовывали боковые побеги уже на щитке (1-2 шт.).

Экспланты роз сорта Нью Доун садовой группы плетистых крупноцветковых при культивировании на питательной среде не выделяли фенольных соединений.



Начало развития вегетативных почек розы сорта Дольче Вита в условиях *in vitro*

Высокий коэффициента размножения (1:5) был отмечен у сортов группы миниатюрных роз Рулети и Цвергкениг, при этом наблюдали незначительное количество эксплантов выделяющих фенолы в питательную среду.

После 2 недель культивирования экспланты всех сортов роз были перенесены на питательную среду Ra с добавлением 1 г/л активированного угля. На этой среде почки роз успешно развивались, однако продолжительное культивирование (в течение 3 недель) на этой среде приводило к некрозу тканей, оводнению почек, остановке их развития.

Появление фенольных соединений в питательной среде (табл. 2) в большей степени отмечали у сорта Роза Брактеата (100%), в наименьшей – у сортов миниатюрных роз Цвергкениг и Рулети (22,2 и 27,9% соответственно).

Таблица 2

Развитие эксплантов розы садовой на среде Ra после введения вегетативных почек в условия *in vitro*

Сорт	Приживае- мость эксплантов, %	К-во эксплантов в основании которых образовывались полифенолы, %	Коэф- фициент размно- жения	Количество листьев	
				в начале развития	через 3 недели культиви- рования
Роза Брактеата	0	100	0	0	0
Климентина	90	70	1:2	2	4
Дольче Вита	100	75	1:2	3	5
Конрад Хенкель	90	63,6	1:3	3	5
Нью Доун	100	11,1	1:2	3	4
Аджимушкай	100	60	1:2	3	5
Симпатия	90,1	45,4	1:4	3	4
Коралловый Сюрприз	100	63,6	1:2	2	4
Леди Ридинг	100	75	1:2	3	5
Казино	100	65	1:2	3	5
Херсонес	100	37,2	1:2	3	5
Пусста	100	18,1	1:2	2	4
Шокинг Блю	100	26,6	1:2	2	5
Айсберг	93,9	100	1:2	3	5
Рулети	93,9	27,9	1:5	3	5
Цвергкениг	100	22,2	1:5	3	5
Джордж Диксон	100	0	1:2	3	5
Капитан Хейворд	100	0	1:2	3	5

Как показали наши исследования, из 2-х вариантов питательных сред лучшее развитие почек у роз ремонтантной группы отмечено на питательной среде Ra, дополненной 1 г/л активированного угля, поэтому на эту среду были перенесены экспланты всех сортов роз.

Процент жизнеспособных микропобегов от общего количества после субкультивирования со среды Ra на среду Rb достигал 100% у сортов Айсберг, Дольче Вита, Коралловый Сюрприз, Леди Ридинг, Нью Доун, Рулети и Цвергкениг. Менее жизнеспособными оказались микропобеги сортов Аджимушкай и Симпатия (40% и 52,7% соответственно), Джордж Диксон (63,7%), Херсонес (67%), Пусста (67%).

Выводы

Таким образом, показана возможность введения в культуру *in vitro* 18 сортов роз 9 садовых групп. Полученные результаты будут использованы для разработки клonalного микроразмножения различных сортов розы садовой и создания генобанка *in vitro*. При этом необходим постоянный генетический контроль культиваров, размножаемых и сохраняемых длительное время *in vitro*.

Список литературы

1. Иванова Н.Н., Митрофанова О.В., Клименко З.К., Алексеева Е.Р. Особенности микроразмножения розы садовой // Тез. докл. Междунар. конф. молодых ученых «Проблемы дендрологии, садоводства и цветоводства», Ялта, 24-26 октября 1994 г. – Ялта, 1994. – С.38-39.
2. Клименко З.К. Розы. – М.: ЗАО «Фитон», 2001. – 176 с.
3. Митрофанова О.В., Использование методов биотехнологии в сохранении генофонда растений // Сессия совета ботан. садов Украины «Ботанические сады – центры сохранения биологического разнообразия мировой флоры», Ялта, 13-16 июня 1995 г. – Ялта, 1995. – С.146-147.
4. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В. Состояние и перспективы развития биотехнологических исследований садовых культур на юге Украины // Садівництво / Міжвідомчий тематичний науковий збірник. – 2000. – Вип.50. – С. 281-296.
5. Engelmann F. Present development and use of *in vitro* techniques for the conservation of plant genetic resources // Acta Horticulture. – 1997. № 447. – P. 471-475.
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiologia plantarum. – 1962. – V. 15. – P. 473-497.

Introduction in culture *in vitro* of perspective rose cultivars of various garden groups for creation of growth collection

Movchan O.P., Mitrofanova I.V., Klimenko Z.K., Rabotaygov V.D.

The preliminary investigations on clonal micropropagation of 18 cultivars of roses of nine gardens groups for the subsequent creation of gene-pool collection have been carried out. The sterilization method of the primary explants was developed. The nutrient mediums for stages of vegetative buds introduction in culture *in vitro* and induction of microshoots proliferation have been selected.