



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 581.1.035

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА РОСТ И РАЗВИТИЕ РОЗ *IN VITRO*

С.К. Мухамбетжанов, С.В. Нам, Н.А. Вечерко, В.К. Мурсалиева

Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы

В статье обсуждаются факторы, влияющие на рост и развитие культуры тканей роз *in vitro*: способы стерилизации посадочного материала, природа эксплантов, состав питательных сред, генотип донорных растений, условия и приемы выращивания материала *in vitro*, стадия развития эксплантов и возраст растений доноров.

Введение

Род роза (*Rosa* L.) относится к семейству розоцветных. В настоящее время род насчитывает около 400 видов и более 30 тысяч форм и сортов [1, 2]. Многочисленные сорта и формы роз сосредоточены главным образом в коллекциях ботанических садов, дендрариев. К сожалению, в ассортименте питомников набор сортов, несмотря на высокий спрос, крайне ограничен. Маточные насаждения представлены, как правило, формами, отличающимися легкостью размножения, но не всегда обладающими высокой декоративностью и не пользующихся коммерческим спросом. Прежде всего, это связано с отсутствием экономически рентабельной, универсальной технологии быстрого размножения роз. Следовательно, возникает необходимость в разработке регламентов массового тиражирования посадочного материала роз, которые были бы универсальными для различных сортов и позволили бы создать рентабельную технологию быстрого воспроизводства качественного посадочного материала, и явились бы альтернативами обычным методам размножения вследствие их трудоемкости, ограниченности генофонда и высокого выхода стерильного семенного материала. Эту проблему можно преодолеть с помощью технологий культуры тканей [3].

Первые сообщения о выращивании роз в культуре *in vitro* были сделаны Эллиотом

(Elliot, 1970) и Якобсом (Jacobs et al, 1970) в 70-е годы прошлого столетия [4, 5]. В дальнейшем Скирвин и Чу (Skirvin, Chu, 1979), Хасегава (Hasegawa, 1979) усовершенствовали протоколы для индукции роста и развития роз в асептических условиях [6, 7]. С этого времени появилось множество работ, посвященных методам культивирования роз *in vitro*, основные результаты которых были обобщены в ряде обзоров [8-12]. В которых было показано, что при введении в асептические условия и дальнейшем культивировании изолированных органов и тканей роз необходимо учитывать природу эксплантов, способы стерилизации посадочного материала, составы питательных сред, генотип донорных растений, условия и приемы выращивания материала *in vitro*, стадию развития эксплантов и возраст растений доноров.

Наиболее важным моментом является выбор материнского растения и экспланта. При выборе донорного растения необходимо учитывать его физиологические и сортовые особенности. При отборе экспланта необходимо учитывать его возраст, строение и происхождение.

Успех введения в культуру часто определяется эффективностью стерилизации. Выбор стерилизующего агента определяется особенностями экспланта. У роз часто внутреннее заражение исходных эксплантов бывает намного сильнее, чем поверхностное, поэтому экспланты



предварительно обрабатывают антибиотиками против грибной и бактериальной инфекций.

В зависимости от типа экспланта используют как твердые, так и жидкие питательные среды. Иногда жидкие среды имеют преимущество, так как обеспечивают большую подвижность трофических элементов. Состав питательной среды необходимо подбирать для каждого сорта роз. При этом, кроме минеральной основы культуральных сред, внимание следует обращать на состав регуляторов роста, особенно фитогормонов. В качестве источника углеродного питания используют различные углеводы типа сахарозы, глюкозы, фруктозы, галактозы. Разные экспланты и генотипы роз требуют различной концентрации углеводов на разных этапах культивирования.

К физическим факторам выращивания относятся температура и условия освещения. В большинстве случаев культуральные сосуды с эксплантами роз содержат на свету при интенсивности освещения 1000-3000 Лк и 14-16-часовым фотопериодом.

Температура культивирования обычно варьирует в интервале 21–25°C. В некоторых случаях предварительное выдерживание материала при низких положительных температурах ведет к повышению эффективности размножения.

На эффективность размножения роз *in vitro* могут также влиять расположение экспланта на среде (горизонтальное или вертикальное), а также соотношение объема эксплантов и количества питательной среды для оптимального освещения и газообмена эксплантов.

Таким образом, для успешного культивирования роз необходимо учитывать перечисленные выше факторы, влияние которых будет подробно рассмотрено ниже.

Факторы, влияющие на культивирование роз *in vitro*

Стерилизация посадочного материала

Поверхностные покровы всех органов растений обычно загрязнены бактериями и спорами грибов, тогда как внутренние ткани здоровых, неповрежденных растений хотя и считаются стерильными, но и здесь не может быть абсолютной стерильности. Для поверхностной дезинфекции растительного материала применяют широкий набор химических реагентов как по отдельности, так и в комплексе друг с другом – ступенчатая стерилизация [13-16]. Способы поверхностной стерилизации посадочного материала роз приведены в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, эффективность освобождения от контаминантов биологической природы зависит от способа и продолжительности стерилизации. Так, в работе Мухитдиновой и Сыртановой (1990) стерилизация в 0,1% растворе сулемы в течение 10 мин была эффективной для побегов с почками [16]. В другом исследовании (Kornova, Angeliev, 1996) оптимальным было выдерживание материала в 8-10% растворе гипохлорита натрия или кальция (8-10 мин) [17]. При таком режиме стерилизации процент инфицированных эксплантов составил 66,3 и 50,0% соответственно. Кроме того, он был щадящим для вегетативных почек, и погибших почек не отмечали. Некоторые авторы (Razavizadeh, Ehsanpour, 2008) для поверхностной стерилизации использовали ступенчатый способ с использованием двух и более стерилизующих веществ: этанол (70%) 1-2 мин + гипохлорит натрия (2% р-р) с добавлением 2-х капель Твин-80 [18]. В других экспериментах экспланты обеззараживали 20 мин в 1% растворе тимерозала +1 мин в 70% растворе этанола +1,5 мин в 0,8% растворе азотнокислого серебра [15]. Количество эксплантов, свободных от контаминации, достигало 100%, однако экспозиция была губительной для вегетирующих почек, число некротирующих эксплантов составляло 47% [15]. В предпринятых нами предварительных исследованиях стерилизация растительного материала 70% раствором этилового спирта в течение



1 мин и последующая обработка 0,1% раствором сулемы в течение 10-15 мин давало положительные результаты.

В целом, способ ступенчатой стерилизации был более эффективным в сравнении с одноступенчатым способом.

При работе с семенами, листьями, корнями к раствору основного стерилизующего агента добавляют смачивающие вещества (Типол, Твин-80), способствующие лучшему распределению стерилизатора по их поверхности и, следовательно, предотвращению выживания микроорганизмов [18].

Таблица 1
Способы стерилизации посадочного материала роз

Способ стерилизации*	Источник
сулема (0,1% р-р) 10 мин	Мухитдинова, Сыртанова, 1990
гипохлорит натрия (1-1,5% р-р) 8-10 мин	Kornova, Angeliev, 1996
гипохлорит натрия (5,2% р-р) 10-30 мин	Skirvin и др., 1990;
отбеливатель (10% р-р) 15 мин	Jabbarzadeh, Khosh-Khui, 2005
этанол (70% р-р) 30 сек. + сулема (0,1 р-р) 2 мин	Barna, Wakhlu, 1995
тимерозал (1% р-р) 20 мин + этанол (70% р-р) 1 мин + азотнокислое серебро (0,8%) 1,5 мин	Кондратенко и др., 2001
этанол (70% р-р) 2 мин + отбеливатель, 5 мин	Ma и др., 1996
этанол (80% р-р) 3-4 сек. + отбеливатель, 15-20 мин	Nikbakht и др., 2005
этанол (70%) 1-2 мин + гипохлорит натрия (2% р-р) с добавлением 2-х капель Твин-80	Razavizadeh, Ehsanpour, 2008
гентамицин, ампицилин, тетрациклин, амоксицилин (100 мг/л)	Khosh-Khui, Silva, 2006

Примечание: Во всех случаях после стерилизации материала его отмывают от стерилизующих агентов путем промывания в 3-5 порциях стерильной дистиллированной воды.

Часто для поверхностной стерилизации используют хлорсодержащие промышленные отбеливатели. Одни исследова-

тели для этих целей выдерживали материал в течение 10-30 мин в 10% растворе отбеливателя «Хлоракс» [14], другие применяли 5-минутную стерилизацию в отбеливателе «Белизна» [15].

Розы часто бывают заражены патогенами бактериальной природы, которые имеют латентный период внешнего проявления при культивировании. Высвобождение от них достигается вторичным циклом дезинфекции или внесением в питательную среду антибиотиков на этапе введения в культуру, например, гентамицина, ампицилина, тетрациклина, амоксицилина, которые вносятся в среду культивирования обычно в концентрации 100 мг/л [11, 17]. Следует обратить внимание, что стерилизацию антибиотиками нужно проводить совместно с предварительной поверхностной стерилизацией посадочного материала.

Таким образом, при выборе стерилизующих агентов следует учитывать их концентрацию и комбинацию, продолжительность экспозиции, тип экспланта и природу контаминации.

Эксплант

При введении в культуру клетки и ткани растений, находящихся на крайней стадии дифференциации, т.е. являющихся высокоспециализированными, при воздействии регуляторов роста переходят в дедифференцированное состояние и возобновляют меристематическую активность.

У роз в качестве эксплантов используют разные части и органы растения: верхушечные, пазушные и цветочные почки, апикальные меристемы, побеги с листовыми узлами, лепестки, пыльники, завязи, сегменты листовых пластинок, корни, незрелые зародыши и семена (таблица 2) [19-28].

Выбор экспланта в значительной степени определяется задачами исследования. В большинстве случаев верхушечные, пазушные, цветочные почки и



побеги с меристематическими тканями узлов используют для получения и размножения побегов в культуре *in vitro* [4, 19, 20, 21]. Однако в некоторых исследованиях отмечается, что использование в качестве эксплантов черенков с апикальными почками ингибирует рост пазушных почек. Кроме того, при использовании в качестве эксплантов побегов с почками и узлами, они выделяют в питательную среду вещества фенольной природы, ингибирующих их развитие в асептических условиях. Апикальные меристемы культивируют для индукции каллусогенеза с последующей индукцией морфогенетических процессов и получения оздоровленного материала [22]. В наших экспериментах активно вегетирующие побеги, взятые у однолетних растений, оказались более отзывчивыми к введению их в культуру.

Листья, корни, лепестки чаще применяют для получения каллусной ткани

и перевода ее в суспензионную культуру или индукции соматического эмбриогенеза [23, 24]. Индукция морфогенетических процессов из репродуктивных органов достигается в культуре пыльников и завязей и направлена на получение гаплоидных растений, вовлекаемых в селекционный процесс [25, 26]. Незрелые зародыши используются для индукции каллусогенеза и получения из каллусной ткани соматических зародышей [27]. Эмбриокультура позволяет также преодолеть барьеры постгамной несовместимости, путем сохранения жизнеспособности гибридных зародышей в условиях *in vitro*, что особенно важно при выведении новых сортов роз, являющихся сложными гибридами и дающих слабый семенной материал. Культивирование незрелых семян позволяет стимулировать прямое образование побегов [28].

Таблица 2

Органы и ткани роз, используемые в качестве эксплантов для культивирования роз *in vitro*

Вид	Эксплант	Тип регенерации*	Источник
<i>Rosa multiflora</i>	верхушечные почки	ОПП*	Elliot, 1970
<i>R. hybrida</i>	пазушные почки	ОПП	Acker, Scholten, 1995
<i>R. hybrida</i>	цветочные почки	ОПП	Arif, Khatamian, 1991
<i>R. hybrida</i>	апикальные меристемы	К*; ОК*	Barve и др., 1984
<i>R. hybrida</i>	меристематические ткани узлов	ОПП	De Vries, Dubois, 1988
<i>R. hybrida</i>	листья	К, ПП*; ОК	Kintzios и др., 2000
<i>R. hybrida</i>	корни	К	Dicleman и др., 1998
<i>R. damascene</i> , <i>R. hybrida</i>	пыльники	К, А*	Tabaezadeh, Khosh-Khui, 1981
<i>R. hybrida</i> R.	завязи	К, Г*	Arene и др., 1993
<i>R. chinensis</i>	лепестки	К	Shanti, 1996
<i>R. rugosa</i> , <i>R. wichuraiana</i> , <i>R. odorata</i>	незрелые семена	ОПЭ*	Asano, Tanimoto, 2002
<i>R. rugosa</i>	незрелые зародыши	ОПЭ, К	Dohm и др., 2001

Примечания: ОПП – образование пазушных побегов; ИЦ – индукция цветения; ОК – органогенез из каллуса; ПП – получение протопластов; К – каллусогенез; А – андрогенез; Г – гиногенез; ОПЭ – органогенез прямо из экспланта.

В целом следует отметить, что для обеспечения максимальной стабильности культивируемого материала роз, в качестве экспланта желательнее использовать молодые, слабо дифференцированные ткани.

Лучше всего использовать апикальные и пазушные почки, зародыши, молодые листья, то есть экспланты, содержащие меристемы. Кроме того, экспланты, взятые от ювенильных растений, лучше



укореняются, чем от взрослых, одресневших растений.

Питательная среда

Основу всех питательных сред для выращивания культур тканей роз составляют: макро- и микроэлементы, витамины, источники железа и углеводов, органические добавки, а их гормональный состав является ключевым фактором для успешного культивирования *in vitro*. Для выращивания роз в стерильных условиях используют питательные среды Мурасиге и Скуга, Шенка-Хильдебранта, Гамборга-Эвелеге (В₂), WPM, Кюрина-Лепойве, Тьюлека-Таггарта-Колавито, Нэша, Несиуса-Ючитила-Флетчера. Выбор той или иной питательной среды обуславливается целями и задачами исследования (таблица 3).

Так, среды Мурасиге и Скуга, Гамборга и Эвелеге В5 наиболее часто используют на этапе введения в культуру. Вместе с тем, среда Мурасиге и Скуга в различных модификациях применяется на всех этапах выращивания эксплантов роз [12, 29]. Другие среды являются более специализированными. Развитие вегетативных почек и микрочеренков роз лучше идет на средах Кюрина-Лепойве и WPM [10, 19]. Для получения каллусной ткани и ее культивирования рекомендуются среды Кнопа-Бертелота, Дрюарта [5, 28]. Среда

Шенка-Хильдебранта благоприятна для индукции эмбриогенеза [11]. Суспензионные клеточные культуры роз выращивают на средах Нэша, Тьюлека-Таггарта-Колавито, Несиуса-Ючитила-Флетчера [30].

Для роста и дифференциации изолированных тканей и органов роз в условиях *in vitro* необходимо присутствие в среде ростовых регуляторов, особенно фитогормонов. В большинстве случаев для индукции ростовых процессов в питательные среды вносят различные концентрации и комбинации цитокининов и ауксинов, как по отдельности, так и в сочетании друг с другом (таблица 4).

Присутствие в культуральной среде фитогормонов группы цитокининов на этапе введения в культуру стимулирует образование добавочных побегов и активизирует развитие апикальных почек. Наиболее часто при выращивании роз в асептических условиях используют 6-бензиламинопурин (БАП), тидиазурон (ТДЗ), кинетин и зеатин в концентрации 0,1-5 мг/л [31-34]. При этом замечено, что на начальных этапах культивирования БАП тормозит формирование корней [33].

Фитогормоны ауксиновой природы – 2,4 Д, дикамба, в концентрации 5-18,1 мМ/л, благоприятствуют индукции процесса каллусогенеза на начальной стадии культивирования [35, 36].

Таблица 3

Среды, используемые для культивирования роз *in vitro*

Название среды	Применение	Источник
Мурасиге и Скуга (МС)	введение в культуру, индукция геммогенеза, ризогенеза, эмбриогенеза, культура каллусов	Khosh-Khui, Silva, 2006
Шенка-Хильдебранта (ШХ)	культура каллусов, индукция эмбриогенеза	Khosh-Khui, Sink, 1982; Kamo и др., 2005
Гамборга-Эвелеге (В ₂)	введение в культуру, геммогенез	Furucih, Jyutori, 1994
Кнопа-Бертелота	культура каллусов	Jacob и др., 1970
Дрюарта	культура каллусов	Valles, Boxus, 1987
WPM (Woody Plant Media)	индукция геммогенеза	Arif, Khatamian, 1991
Кюрина-Лепойве (КЛ)	индукция геммогенеза	Carelli, Echeverrgaray, 2002
Нэша	суспензионная культура	Калинин и др., 1980
Тьюлека-Таггарта-Колавито	суспензионная культура	Калинин и др., 1980
Несиуса-Ючитила-Флетчера	суспензионная культура	Калинин и др., 1980



Замечено, что на эффективность протекания процессов морфогенеза в культуре тканей роз существенное влияние оказывает в основном баланс между цитокининами и ауксинами. Обнаружено, что более высокое соотношение цитокининов к ауксинам повышает коэффициент образования побегов из одного экспланта [10, 18, 33, 37, 38]. Некоторые авторы отмечают, что дополнительное внесение в питательную среду гибберелина позволяет увеличить коли-

чество формирования адвентивных почек и ускорить процесс образования побегов из первичных эксплантов [39, 40].

Следует отметить, что приведенные в таблице 4 соотношения фитогормонов используют в основном на этапе введения в культуру. Для индукции процессов морфогенеза из тканевых культур роз, в каждом конкретном случае, в зависимости от цели эксперимента, применяют другие концентрации и сочетания фитогормонов.

Таблица 4

Концентрации и комбинации фитогормонов, используемых при введении роз в культуру *in vitro*

Среда, концентрация и комбинация фитогормонов	Применение	Источник
МС, 0,13-1,3 мМ/л БАП	Индукция побегообразования из апикальных почек	Bressan и др., 1982
МС, 1-5 мг/л БАП + 0,1-0,25 мг/л ГКЗ	Ускорение индукции побегообразования из апикальных почек	Pati и др., 2001
МС, 6,8 мМ/л тидиазурон + 0,49 мМ/л ИМК	Образование адвентивных почек из листовых эксплантов	Ibrahim, Debergh, 2001
МС, 3 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК	Индукция побегообразования из пазушных почек	Carelli, Echeverrigary, 2002
МС, 5 мМ/л БАП	Индукция побегообразования из листовых эксплантов пробирочных растений	Pati и др., 2004
МС, 1,5 мг/л БАП + 0,25 мг/л зеатин	Индукция побегообразования из апикальных почек	Roy и др., 2004
МС, 2,5-3 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИБК	Индукция побегообразования из побегов с одиночными узлами	Jabbarzadeh, Khosh-Khui, 2005
Шенка-Хильдебранта, 13,6 мМ/л 2,4-Д или 18,1 мМ/л дикамба + 0,46 мМ/л кинетин	Индукция каллусообразования из зрелых зародышей	Kamo и др., 2005
МС, 1-2 мг/л БАП + 0,1 мг/л ГКЗ + 0,1 мг/л НУК	Ускорение и повышение коэффициента индукции побегообразования из побегов с одиночными узлами	Nikbakht и др., 2005
МС, 4 мг/л БАП + 2 мг/л кинетин + 0,1 мг/л НУК	Индукция побегообразования из апикальных почек	Bharadwaj и др., 2006
МС, 5-15 мМ/л 2,4-Д	Индукция каллусообразования из зрелых зародышей	Kaur и др., 2006
WPM, 1-2 мг/л БАП	Индукция побегообразования из апикальных почек	Rosa, Belarmino, 2007
T5, 5 мг/л БАП + 0,1 мг/л ИБК	Индукция побегообразования из апикальных почек	Razavizadeh, Ehsanpour, 2008

В большинстве случаев, для культивирования роз используют твердые питательные среды, где в качествежелирующего вещества используют агар. На этапе введения в культуру берут более высокие концентрации агара – 7-8 г/л, на

этапе укорения *in vitro* концентрацию агара понижают до 4,5 - 6 г/л [40]. Иногда, кроме агара, на этапе укоренения, в этих целях применяют гелерит (фитогель) (таблица 5) [28, 41].



Таблица 5

**Гелеобразующие вещества и источники углеводов,
используемые при культивировании роз *in vitro***

Вид, сорт	Гелеобразующее вещество, концентрация	Источник углеводов, концентрация	Источник
<i>R. damascena</i> , <i>R. hybrida</i>	агар "Difco", 10 г/л	сахароза, 20 г/л	Tabaezadeh, Khosh- Khui, 1981
" <i>Dame of Shark</i> "	агар, 8 г/л	сахароза, 40 г/л	Lloyd и др., 1988
<i>R. damascena</i>	гельрит, 2,5 г/л	сахароза, 30 г/л	Ishioka, Tanimoto, 1990
<i>R. winchuraiana</i>	агар, 8 г/л	сахароза, 40 г/л	Roberts и др., 1990
" <i>Хоровод</i> "	агар, 7 г/л	сахароза, 30 г/л	Мухитдинова, Сыртанова, 1990
" <i>Tajmahal</i> "	агар "Difco", 6 г/л	сахароза, 40 г/л	Rahman и др., 1992
" <i>Madame G. Delbard</i> "	агар "Bacto", 7 г/л	сахароза, 87,7 мМ	Sallanon, Maziere, 1992
<i>R. rugosa</i>	агар, 7 г/л	галактоза, 0,1-0,2 М	Kunitake и др., 1993
<i>R. rugosa</i>	агар, 7 г/л	фруктоза, 0,1 М	Kunitake и др., 1993
<i>R. rugosa</i>	агар, 7 г/л	сорбитол, 0,1 М	Kunitake и др., 1993
<i>R. hybrida</i>	гельрит, 2,5 /л	сахароза, 20 г/л	Furuichi, Jyutori, 1994
<i>R. hybrida</i> , <i>R. chinensis</i>	агар, 8 г/л	сахароза, 30 г/л	Barna, Wakhlu, 1995 Salehi, Khosh-Khui, 1996
<i>R. hybrida</i>	агар, 7 г/л	глюкоза 111,0 мМ	Hsia, Korban, 1996
<i>R. minima</i>	агар, 7 г/л	сахароза 59,0 мМ	Hsia, Korban, 1996
<i>R. hybrida</i>	фитогель, 2,5 г/л	сахароза, 30 г/л	Sarasan и др., 2001
" <i>Shortcake</i> "	гельрит, 2,5 /л	сахароза, 30 г/л	Asano, Tanimoto, 2003
<i>R. hybrida</i>	агар, 8 г/л	сахароза, 30 г/л	Razavizadeh, Ehsanpour, 2008

В средах, используемых для культуры тканей роз, источником углеродного питания и энергии на этапе введения в культуру обычно является сахароза, в концентрации 30 г/л. Специальное исследование влияния сахарозы на культуру изолированных тканей роз предпринято Ву и др. [42]. Авторы протестировали разные концентрации сахарозы (15, 30, 45 г/л). Результаты экспериментов показали, что питательная среда, содержащая сахарозу в концентрации 30 г/л, является оптимальной на этапе введения в культуру эксплантов роз различного происхождения. В некоторых случаях добавляют другие сахара: глюкозу, фруктозу, галактозу, иногда спирты, например, сорбитол в различных концентрациях (таблица 5) [43, 44].

Важное значение имеет рН среды. От величины рН зависит устойчивость и усвояемость ряда компонентов питательной среды. Кроме того, при низких величинах рН не происходит затвердения агара. Для большинства культур изолированных тканей роз оптимальным является значение рН 5,5-5,8 [11].

Как видно, в основе выбора питательной среды для культивирования роз лежат общепринятые в культуре тканей принципы, но при этом учитываются биологические особенности роз и цели исследования. Приведенные в таблице 3 питательные среды и их модификации являются в настоящее время основой для культивирования роз.

Генотип исходных растений

Одним из основных факторов, контролирующих рост и развитие роз при их культивировании *in vitro*, является генотип исходного материала [12]. Получены экспериментальные доказательства зависимости индуцированного морфогенеза от генетических особенностей исходных эксплантов у различных видов и сортов роз [45-49]. При этом замечено, что гибридные формы растений более отзывчивы к росту и развитию *in vitro* по сравнению с чистыми линиями и сортами. Преимущество использования гибридного материала при культивировании роз показано в ряде работ



[16, 50]. Анализ описанных исследований позволяет сделать вывод о том, что способность различных эксплантов роз к проявлению морфогенетических потенций, контролируется генетически.

Вместе с тем, имеются работы, показывающие, что в отличие от других цветочно-декоративных растений, влияние генотипа на морфогенез *in vitro* у роз выражено слабее [51, 52]. Однако в наших собственных исследованиях, при тестировании на отзывчивость к культивированию сортов роз, принадлежащих к пяти садовым группам, показало, что наиболее отзывчивыми являются сорта, относящиеся к группе чайно-гибридных роз.

Вместе с тем, при сравнительной оценке генетических потенций видов и сортов встает вопрос о правомерности использования при этом идентичных условий, ибо изменение условий может привести к иной ранжировке генотипов по их способностям к реализации их морфогенетических потенций.

В этой связи подбор оптимальных условий культивирования представляет сегодня одну из наиболее сложных задач. Подобранные опытным путем оптимальные условия для культивирования роз одного вида или даже сорта, как правило, оказываются неприемлемыми для других генотипов и требуют значительных модификаций и разработки новых методических процедур.

Условия культивирования

Одним из параметров, влияющих на рост и развитие роз в асептических условиях является температура. Влияние температуры на рост и развитие роз в условиях *in vitro* было изучено Аскером (Acker, 1995) [45, 52]. Экспланты роз, включая побеги с разными типами почек, дают адекватный ответ при температуре инкубирования в интервале от 21-25°C. Так, в одних случаях сосуды с тканевыми культурами держали при температуре 21°C [53, 54], в других – требовалась чуть более высокая

температура (22°C) [55]. Однако наиболее оптимальной для формирования побегов *de novo* и их культивирования с последующей мультипликацией геммогенеза является температура 25°C [11, 56]. Некоторые авторы отмечают положительное влияние на индукцию побегообразования предварительной холодной обработки посадочного материала в течение 7 дней при низких положительных температурах (10°C) [50].

Достоверных доказательств действия света на культуру роз нет. Для стимуляции появления адвентивных побегов из первичных эксплантов (почки, побеги с листовыми узлами) их обычно содержат на свету с 14-16-часовым фотопериодом, однако замечено, что в первые дни после перевода в асептические условия они активно выделяют в питательную среду вещества фенольной природы, игибирующих их развитие. Для предотвращения этого явления, наряду с другими приемами, рекомендуется инкубирование их в темноте в течение 2-4 дней. Для индукции каллусогенеза их содержат в темноте до появления каллуса [7, 11, 12]. Указанные выше температурные и световые режимы не являются универсальными, поэтому в каждом конкретном случае их следует подбирать опытным путем для каждого вида и сорта роз.

Сосуд для культивирования. Единственное систематическое исследование этого параметра для роз провел Козаи с сотрудниками (Kozai и др., 2000). Было показано, что при культивировании эксплантов в сосудах меньшего объема результат был намного хуже в сравнении с их выращиванием в сосудах большего объема [57]. Кроме того, некоторые авторы указывают, что при коммерческом тиражировании использование больших сосудов значительно уменьшает издержки производства [58].

Стадия развития эксплантов и их расположение на побеге, сезонность и возраст растений доноров



В ряде экспериментов выявлено, что регенерационная способность тканевых культур роз зависит от стадии развития эксплантов, их расположения на побеге, сроков введения в культуру и возраста растений доноров [15, 16, 51].

Так, в одном исследовании, при помещении почек из апикальной зоны побега на питательную среду экспланты погибали [15]. Кроме того, культивирование побегов с верхушечными почками ингибировало развитие боковых почек, поэтому скорость размножения увеличивали снятием апикального доминирования. В другом исследовании, культивирование почек с зоны, расположенной ближе к основанию побега, приводило к регенерации микропобегов, но их развитие протекало медленными темпами [15, 16]. Однако многие авторы отмечают, что более эффективным является культивирование пазушных почек, взятых со средней части побега [15, 16, 31].

Анализ данных литературы показывает, что почки, взятые с 2-3-летних растений роз, обладают более низкими морфогенетическими потенциями, чем почки, взятые с однолетних побегов. При этом удалось выявить зависимость развития почек от времени их отбора. Материал для культивирования отбирали в весенний (март-май), летний (июнь-август), осенний (сентябрь-ноябрь) и зимний (декабрь-февраль) сезоны. Наиболее благоприятным сроком отбора эксплантов для введения в культуру *in vitro* является август. В этот период процент развившихся эксплантов составил 72-78%. Менее благоприятным сроком отбора оказался январь и декабрь [15, 29].

Число почек на побегах и степень их развития в момент переноса на питательную среду обычно не контролируют. Однако в некоторых исследованиях было отмечено, что размеры побегов образовавшихся *in vitro*, положительно коррелируют с

размерами исходных почек, при этом лучшей регенерационной способностью обладают почки более крупного размера, клонирование которых возможно уже в первом пассаже [20, 49].

Таким образом, множественность индуцирующих факторов и недостаточная изученность механизма их действия на процессы морфогенеза в культуре тканей роз заставляет исследователей действовать эмпирически, подбирая оптимальные условия и корректируя их для разных видов и сортов растений.

Заключение

Таковы основные результаты, полученные в последние годы в экспериментах по культивированию роз *in vitro*. Исследования в этом направлении в ближайшем будущем могут дать ответ на ряд теоретических вопросов, а именно: экспланты какой природы более способны к восприятию индуцирующих воздействий и адекватному ответу на них, проявляя весь диапазон морфогенетических потенций вплоть до регенерации целого растительного организма. С практической точки зрения, тканевая культура может оказаться полезной при создании сортов и форм роз с желаемыми коммерческими и генетическими характеристиками.

Все возрастающее количество работ, в которых достигнута регенерация растений роз *in vitro*, убедительно показывает перспективность и актуальность исследований в этом направлении. Особенно это относится к сортам роз, имеющих коммерческое значение. Поэтому, дальнейшая оптимизация протоколов культуры ткани крайне важна для разработки экономически рентабельных, универсальных для всех видов и сортов роз биотехнологий ускоренного размножения и сохранения.



Литература

1. Писарев Е.А. Розы. Энциклопедия. – М.: Эксмо, 2008. – 288 с.
2. Мовсесян Л.И. Выращиваем шикарные розы – это непросто! – Ростов-на-Дону, 2007. – 217 с.
3. Мухамбетжанов С.К., Мурсалиева В.К. Использование технологии микроклонального размножения для получения элитного посадочного материала роз // Сб. тр. междунар. конф. «Биологическое разнообразие и устойчивое развитие природы и общества». - Алматы, 12-13 мая, Казах университети, 2009. – Ч.1. – С. 73-75.
4. Elliot R. F. Axenic culture of meristem tips of *Rosa multiflora* // *Planta*. – 1970. – Vol. 95. – P. 183-186.
5. Jacob G., Allan P., Bornman C.N. Tissue culture studies on rose: use shoot tip explants: II Cytokinin: gibberellin effects // *Agroplanta*. – 1970. – Vol. 2. – P. 25-28.
6. Skirvin R.M., Chu M.C. *In vitro* culture of 'Forever Yours' rose // *Hort. Science*. – 1979. – Vol. 14. – P. 608-610.
7. Hasegawa P.M. *In vitro* propagation of rose // *Hort. Science*. – 1979. – Vol. 14. – P. 610-612.
8. Davies D.R. Rapid propagation of roses *in vitro* // *Sci. Hortic*. – 1980. – Vol. 13. – P. 385-389.
9. Horn W.A. Micropropagation of rose (*Rosa* L.). – In: *Biotechnology in agriculture and forestry*. Edd. Bajaj Y.P.S. – 1992. – Vol. 20. – P. 320-342.
10. Carelli B.P., Echeverrigaray S. An improved system for the *in vitro* propagation of rose cultivars // *Sci Hortic*. – 2002. – Vol. 92. – P. 69-74.
11. Khosh-Khui M., de Silva J.A.T. *In vitro* culture of the *Rosa* species // *Floriculture, Ornamental and Plant Biotech*. – 2006. – Vol. 2. – P. 514-527.
12. Canli F.A., Kazaz S. Biotechnology of roses: progress and future prospects // *Süleyman Demirel Üniver. Orman Fakültesi Dergisi (Seri:A)*. – 2009. – Vol 1. – P. 167-183.
13. Кириченко Е.Б., Фернандо Ш.С., Кузьмина Т.А., Чернядьев И.И. Особенности органогенеза эфиромасличных роз при клональном микроразмножении // *Бюллетень ГБС*. – 1993. – Т. 167. – С. 97-102.
14. Skirvin R.M., Chu M.C., Young H.J. Rose. – In: *Handbook of plant cell culture*. Edd. Ammirato, P.V., Evans D.A., Sharp W.R., Bajaj Y.P.S. – 1990. – Vol. 5. – P. 716-743.
15. Кондратенко О.В., Митрофанов О.В. Микроразмножение *in vitro* миниатюрных роз // *Ученые записки ТГУ (Сер. биол.)*. – 2001. – Т. 14(1). – С. 109-114.
16. Мухитдинова З.Р., Сыртанова Г.А. Ускоренное размножение роз методом клонирования в культуре *in vitro* // *Известия АН КазССР (Сер. биол.)*. – 1990. – N5. – С. 34-39.
17. Kornova K., Angeliev V. *In vitro* propagation of miniature roses // *Propagation of decorative plants*. – 1996. – N 2. – P. 241-246.
18. Razavizadeh R., Ehsanpour A.A. Optimization of *in vitro* propagation of *Rosa hybrida* cultivar Black Red // *Amer-Eurasian J. Agric. and Environ. Sci*. – 2008. – Vol. 3 (1). – P. 96-99.
19. Arif M. B., Khatamian H. *In vitro* propagation of 'Petite Folie' miniature rose // *Transactions of the Kansas Academy of Science*. – 1991. – Vol. 94 (3-4). – P. 116-124.
20. Acker C.A.M., Scholten H.J. Development of axillary buds of rose *in vitro* // *Sci. Horticult*. – 1995. – Vol. 63 (1-2). – P. 47-55.
21. De Vries D.P., Dubois A.M. The effect of BAP and IBA on sprouting and adventitious root formation of "Amanda" rose single-node softwood cuttings // *Sci. Horticult*. – 1988. – Vol. 34 (1-2). – P. 115-121.
22. Barve, D.M., Iyer, R.S., Kendurkar, S., Mascarenhas, A.F. An effective method for rapid propagation of some budded rose varieties // *Indian J. Hort*. – 1984. – Vol. 41. – P. 1-7.
23. Kintzios, S., Drossopoulos, J.B., Lymperopoulos, C. Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from young mature leaves of rose // *J. Plant Nutr*. – 2000. – Vol. 23 (10). – P. 1407-1420.
24. Dielemann J.A., Verstappen F.W.A., Kuiper D. Root temperature effects on growth and bud break of *Rosa hybrida* in relation cytokinin concentration in xylem sap // *Sci Horticult*. – 1998. – Vol. 76 (3-4). – P. 183-192.



25. Tabaezadeh Z., Khosh-Khui M. Anther culture of rosa // *Sci. Horticult.* – 1981. – Vol. 15 (1). – P. 61-66.
26. Arene L., Pellogrino C., Gudin S. A comparison of somaclonal variation level of *Rosa hybrida* L. cv. Meirutral plants regenerated from callus or direct induction from different vegetative and embryonic tissues // *Euphytica.* – 1993. – Vol. 71. – P. 83-90.
27. Dohm, A., Ludwig, C., Nehring, K., Debener, T. Somatic embryogenesis in roses // *Acta Hort.* – 2001. – Vol. 547. – P. 341– 347.
28. Asano, G., Tanimoto, S. Agrobacterium-mediated transformation and transgenic plant regeneration from embryogenic calli derived from an immature seed produced from miniature rose cultivar ‘Shortcake’ // *Plant Biotechnol.* – 2003. – Vol. 20 (4). – P. 291-296.
29. Furuichi T., Jyutori H. On some conditions for root induction from shoots of rose *in vitro* and for subsequent acclimatization of the plantlets potted-up // *Bull. Kagawa Agric. Exp. Stn.* – 1994. – N. 45. – P. 71-77. *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* – 2006. – Vol. 42 (2). – P. 124-127.
30. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наукова Думка. – 1980. – 488 с.
31. Bressan, R.H., Kim, Y.J., Hyndman, S.E., Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. Factors affecting *in vitro* propagation of rose // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* – 1982. – Vol. 107. – P. 979-990.
32. Pati, P.K., Sharma, M., Sood, A., Ahuja, P.S. Direct shoot regeneration from leaf explants of *R. damascena* Mill // *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* – 2004. – Vol. 40 (2). – P. 192–195.
33. Roy P.K., Manum A.N.K., Ahmed G. *In vitro* plantlets regeneration of rose // *Plant Tissue Cult.* – 2004. – Vol. 14 (2). – P.149-154.
34. Rosa Z.S., Belarmino M.M. *In vitro* culture of rose species (*Rosa* spp.) via axillary bud growth // *Annals of Tropical Research.* – 2007. – Vol. 29 (1). – P. 57-64.
35. Kamo K., Jones B., Bolar J., Smith F. Regeneration from long-term embryogenic callus of the *Rosa hybrida* cultivar Kardinal // *In vitro Cell. and Develop. Biol. – Plant.* – 2005. – Vol. 41 (1). – P. 32-36.
36. Kaur N., Pati P.K., Sharma M., Ahuja P.S. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Rosa bourboniana* Desp. // *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* – 2006. – Vol. 42 (2). – P. 124-127.
37. Jabbarzadeh, Z., Khosh-Khui, M. Factors effecting tissue culture of Damask rose (*Rosa Damascena* Mill.) // *Sci. Hort.* – 2005. – Vol. 105. – P. 475-482.
38. Bharadwaj R., Singh S.K., Pal S., Kumar S. An improved protocol for micro-propagation of miniature rose (*Rosa chinensis* Jacq. var. minima) cultivars // *Journal of Ornamental Horticulture.* – 2006. – Vol. 9 (4). – P. 238-242.
39. Pati, P.K., Sharma, M., Ahuja, P.S. 2001. Micropropagation, protoplast culture and its implications in the improvement of scented rose // *Acta Hort.* – 2001. – Vol. 547. – P. 147–58.
40. Nikbakht A., Kafi M., Mirmasoumi M., Babalar M. Micropropagation of damask rose (*Rosa damascene* Mill.) cvs Azaran and Ghamsar // *International. J. of Agricult. and Biol.* – 2005. – Vol. 7 (4). – P. 535-538.
41. Sarasan V., Roberts A.V., Rout G.R. Methyl laurate and 6-benzyladenine promote the germination of somayic embryos of a hybrid rose // *Plant Cell Reports.* – 2001. – Vol. 20. – P. 183-186.
42. Vu N., Anh P., Nhut D. The role of sucrose and different cytokinins in the *in vitro* floral mrphogenesis of rose (hybrid tea) cv. “Firs Prize” // *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.* – 2006. – Vol. 87 (3). – P. 315-320.
43. Kunitake, H., Imamizo, H., Mii, M. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature seed-derived calli of rose (*Rosa rugosa* Thunb) // *Plant Sci.* – 1993. – Vol. 90. – P. 187-194.
44. Hsia, C., Korban, S. Organogenesis and somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* and *Rosa chinensis minima* // *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* – 1996. – Vol. 44. – P. 1-6.
45. Davies, D.R. Rapid propagation of roses *in vitro* // *Sci. Hort.* – 1980. – Vol. 13. – P. 385-389.
46. Dubois, L.A.M., Roggermans, J., Soyeurt, G., Vries, D.P. Comparison of the growth and development of dwarf rose cultivars propagated *in vitro* and *in vivo* by softwood cuttings // *Sci. Hort.* – 1988. – Vol. 35. – P. 293-299.
47. Ibrahim R., Debergh P.C. Factors controlling high efficiency adventitious bud formation and plant regeneration from *in vitro* leaf explants of roses (*Rosa hybrida* L.) // *Scientia Horticulturae.* – 2001. – Vol. 88 (1). – P. 41-57.



48. Kuusiene S., Kandzeauskaite M. The influence of genotype and explant for callus induction and proliferation of *rosa floribunda* // *Proc. of IV Int. Symp. On In Vitro Culture and Horticultural Breeding*. – 2001. – P. 560.
49. Li X., Krasnyanski S.F., Korban S.S. Somatic embryogenesis, secondary somatic embryogenesis, and shoot organogenesis in *rosa* *Journal of Plant Physiology*, 2002, Vol. 159, N 3. – P. 313-319.
50. Ma Y., Byrne D.H., Chen J. Propagation of rose species *in vitro* // *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. – 1996. – Vol. 32. – P. 103-108.
51. Popowich E.A., Brel N.C. Growth and micropropagation of lilac and rose aseptic cultures for prolongating cultivation studying // *Proc. of 9th Int. Conf. of Horticult.* – 2001. – Vol. 3. – P. 665-668.
52. Acker C.A.M. Effect of temperature on development and growth potential of axillary buds in roses // *Sci. Horticult.* – 1995. – Vol. 63 (3-4). – P. 241-250.
53. Leyhe, U., Horn, W. A. Contribution to micropropagation of *Rosa hybrida* // *Gartenbauwissenschaft*. – 1994. – Vol. 59(2). – P. 85-88.
54. Rout, G.R., Samantaray, S., Mottey, J., Das, P. Biotechnology of the rose: a review of recent progress // *Sci. Hort.* – 1999. – Vol. 81. – P. 201-228.
55. Bredmose N., Hansen J., Nielsen J. Factors intrinsic to the axillary bud determine topographic effects on bud and shoot growth and flower development in *Rosa hybrida* // *Int. J. Plant. Sci.* – 1990. – Vol. 160 (5). – P. 819-825.
56. Barna K.S., Wakhlu A.K. Effects of thidiazuron on micropropagation of rose // *In Vitro Cell Dev Biol Plant*. – 1995. – Vol. 31 (1). – P. 44-46.
57. Kozai, T., Kubota, C., Zobayed, S.M.A., Nguyen, T.Q., Afreen-Zobayed, F., Heo J. Developing a mass propagation system of woody plants. – In: *Challenge of plant and agriculture sciences to the crisis of biosphere on the earth in the 21st century*. Edd. Watanabe K, Komamine A. – 2000. – P. 293-306.
58. Chavan D.K., Shah M.K., Mathur R.C. *In vitro* propagation of hybrid tea rose varieties for commercial cultivation // *Phytomorphology*. – 2007. – Vol. 57 (1-2). – P. 85-90.

Түйін

Мақалада *in vitro* жағдайында раушандар ұлпаларының өсуі мен дамуына әсер ететін факторлар анықталған: өсімдік материалды залалсандыру, экспланттардың түрі, қоректік орталардың құрамы, донор өсімдіктер генотипы, өсімдіктерді *in vitro* өсіруге әсерететін жағдайлар мен әдістер, экспланттардың даму сатысы және донор өсімдіктердің жасы.

Summary

In the present article the factors affecting to growth and development of tissue culture of roses *in vitro*, include: methods of plant material sterilization, origin of explants, nutrient media compounds, donor plant genotype, conditions and methods of explants growing, stage of explants development and age of donor plants is discussed.