

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ЦИТОКІНІНУ БАП НА РІСТ ТА РОЗВИТОК ЕКСПЛАНТІВ ДЕЯКИХ СОРТІВ САДОВОЇ ГРУПИ МІНІАТЮРНИХ ТРОЯНД В УМОВАХ *IN VITRO*

Т.І. Пилипчук, аспірант*
І.В. Митрофанова, доктор біологічних наук
Нікітський ботанічний сад

Визначено оптимальні концентрації БАП для індукції пагоноутворення у 6 сортів садової групи мініатюрних троянд. Показано оптимальні терміни культивування 6 сортів мініатюрних троянд на середовищі з додаванням БАП для активного адвентивного пагоноутворення.

Троянда, морфогенез, вегетативна брунька, культура in vitro.

Троянда садова широко використовується в озелененні і займає одне з провідних місць у декоративному садівництві. У Нікітському ботанічному саду – Національному науковому центрі (НБС-ННЦ) є багата колекція садових троянд. Важливою біологічною особливістю мініатюрних троянд є раннє, тривале і з багаторазовим повторенням цвітіння, яке триває в умовах Південного берегу Криму до 200 днів (з середини квітня до грудня-січня), що робить їх незамінними в озелененні садів і парків, де вони можуть бути використані для створення низьких бордюрів і рабаток, а також карликових штамбів. Мініатюрні троянди гарні також у горщечковій культурі [3].

Успішне розмноження мініатюрних троянд можливе із застосуванням методів культури органів і тканин, що дозволяє не тільки оздоровити рослини, але й отримати садивний матеріал у великій кількості, у більш стислі терміни, ніж при використанні традиційних методів розмноження [1, 7].

Дослідження, що проводились у відділі біотехнології і біохімії рослин НБС-ННЦ, показали можливість культивування в умовах *in vitro* деяких перспективних сортів троянд з 9 садових груп. Науковцями були вивчені умови введення *in vitro* вегетативних бруньок та індукції пагоноутворення перспективних сортів троянд з метою подальшого їх тривалого збереження у вигляді повільно зростаючої колекції [2, 4]. Також були вивчені особливості клонального мікророзмноження (одержання асептичної культури, регенерації первинних експлантів і власне мікророзмноження) сортів мініатюрних троянд [5].

Є цілий ряд повідомлень про дослідження декоративних троянд як вітчизняними, так і закордонними вченими. Переважна більшість публікацій присвячена одержанню безвірусного садивного матеріалу і сировини для парфумерної промисловості. У цих роботах вказується, що склад поживного середовища було підібрано шляхом оптимізації концентрацій мікроелементів, вітамінів і регуляторів росту. Для введення в культуру *in vitro* використовували апікальну меристему [8, 9].

Мета досліджень – визначення особливостей росту та розвитку експлантів під впливом різних концентрацій 6-бензиламінопурину.

Матеріали та методика досліджень. Як об'єкти дослідження використано перспективні сорти садової групи мініатюрних троянд з колекції

* Науковий керівник – доктор біологічних наук, професор І.В. Митрофанова

НБС-ННЦ. Сорт селекції НБС-ННЦ: Мальчик-с-Пальчик. Сорти іноземної селекції: Бебі Бантінг, Цвергкеніг, Рулеті, Бігуді, Мандарин.

Як вихідні експланти використовували сегмент пагона (середня частина) з брунькою. Відбір матеріалу здійснювали протягом усього періоду вегетації рослини.

Стерилізацію сегментів пагонів проводили в декілька етапів. Рослинний матеріал промивали у проточній водопровідній воді з мильним розчином, потім промивали проточною водопровідною водою, дистильованою водою і протирали марлевою серветкою, змоченою в 70%-ному етанолі. Зрізавши листя, черешки поміщали в стерильні стакани і послідовно обробляли розчинами стерилізуючих агентів (табл.1).

1. Схема ступеневої стерилізації первинних експлантів троянди

Етап стерилізації	Стерилізуючий розчин	Назва препарату та країна-виробник	Експозиція
1	70%-ний C_2H_5OH	Септол, Україна	1 хв
2	3% -ний $NaClO$	Доместос, Україна	15 хв
3	П'ятиразове промивання у стерильній дистильованій воді		

Експланти після стерилізації в асептичних умовах розміщали у пробірки на агаризованому поживному середовищі. Як базове середовище використовували поживне середовище Мурасіге і Скуга (МС) [10], рН 5,7, доповнене цитокініном – 6-бензиламінопурину (БАП) у різних концентраціях (0,5; 0,75; 1,0; 2,0; 3,0 мг/л та 1,5 мг/л – контроль). Для індукції розвитку експланти розміщували в культуральній кімнаті при температурі 24 ± 1 °С, 16-годинному фотоперіоді та інтенсивності освітлення 2–3 клк.

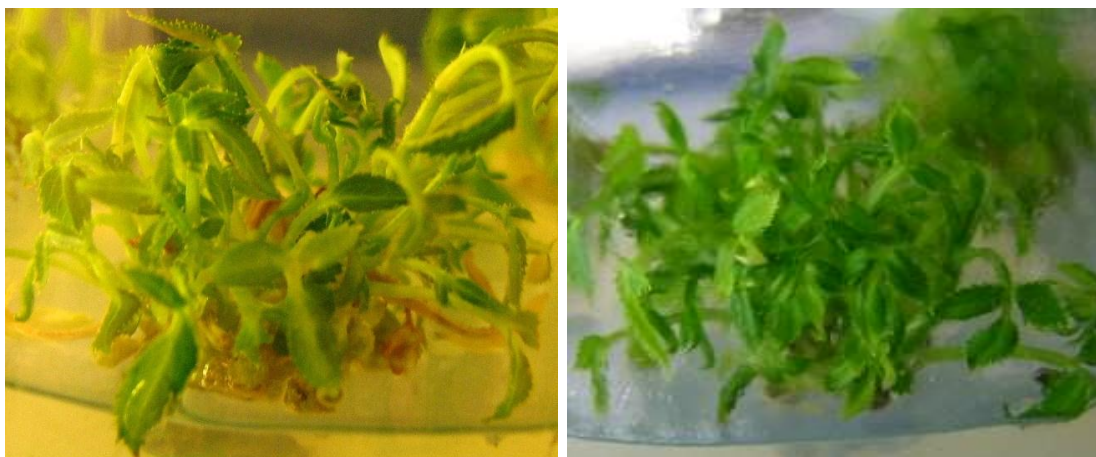
Опрацювання результатів експериментів проводили за допомогою методів статистичного аналізу [6].

Результати дослідження. Експланти 6 сортів мініатюрних троянд (Рулеті, Цвергкеніг, Бебі Бантінг, Бігуді, Мандарин, Мальчик-с-Пальчик) були висаджені на поживні середовища з різною концентрацією БАП. Через три тижні розвитку спостерігали утворення конгломератів мікропагонів у сорту Рулеті на середовищі з 1,5 мг/л БАП (контроль); кількість розгорнутих листків досягала 2–3 шт. на одному мікропагоні й було одержано до 10 адвентивних мікропагонів у конгломераті. На середовищах з концентрацією БАП 0,5; 0,75; 3,0 мг/л експланти утворювали по 2 додаткових мікропагони. При цьому на середовищі з 2,0 мг/л БАП експланти сорту Рулеті не розвивалися. У експлантів сорту Цвергкеніг при всіх концентраціях БАП було відзначено нормальний розвиток мікропагонів. Крім того, на середовищі з 1,5 мг/л БАП у сорту Цвергкеніг усі експланти утворювали конгломерати мікропагонів. На середовищі з концентрацією БАП 0,75 мг/л формування конгломератів мікропагонів відбувалося у 33 % експлантів і 22 % – на середовищі з 1,0 мг/л БАП. У цьому випадку кількість розгорнутих листків на один адвентивний мікропагін досягала 4–5 шт. на середовищі з 1,5 мг/л БАП, до 8 листків на адвентивний пагін – на середовищах з 1,0; 3,0 мг/л БАП. У сорту Бебі Бантінг до 78 % конгломератів мікропагонів утворювалося на середовищі з 2,0 мг/л БАП, 67 % – на середовищі з 1,0 мг/л БАП і 44 % – на середовищі з 1,5 мг/л БАП. У цього сорту кількість розгорнутих листків була 9 шт. на поживному середовищі з концентрацією БАП 2,0 мг/л, до 4 шт. – на середовищі з 1,5 мг/л БАП. Усі експланти сорту Бігуді формували конгломерати мікропагонів на

середовищах з концентрацією БАП 1,0; 2,0; 3,0; 1,5 мг/л. Кількість адвентивних мікропагонів у конгломераті у сорту Бігуді значно збільшувалася – до 14 шт./експлант на середовищі з 2,0 мг/л БАП і до 13 шт./експлант на контрольному варіанті середовища. Кількість розгорнутих листків у цього сорту не перевищувала 1–2 шт. на одному адвентивному мікропагоні при культивуванні на контрольному середовищі та 3–4 листків на мікропагоні на середовищах з 0,75; 3,0 мг/л БАП. У всіх експлантів сорту Мальчик-с-Пальчик спостерігали утворення конгломератів мікропагонів через 3 тижні на середовищах з 0,5 мг/л та 1,5 мг/л БАП, при цьому кількість листків досягала 2–3 шт. і 4–5 шт. на один адвентивний мікропагон відповідно (рис. 1,а). Експланти сорту Мандарин нормально розвивалися на всіх варіантах середовищ. Частота регенерації конгломератів мікропагонів досягала 67 % на середовищі з 1,5 мг/л БАП, 44 % – з 3,0 мг/л БАП і 33 % – з 0,5 мг/л БАП. Утворювалось до 3 розгорнутих листків на мікропагоні в конгломераті, при цьому листки були дуже дрібні (рис. 1,б).

Морфологічні ознаки дослідних сортів при культивуванні протягом 6 тижнів наведено у табл. 2. Так, через 6 тижнів розвитку усі експланти сорту Рулеті утворювали конгломерати мікропагонів. Кількість мікропагонів у конгломераті досягала 16,9 шт. на середовищі з концентрацією БАП 1,5 мг/л, 16,2 шт. – на середовищі з 1,0 мг/л БАП. Максимальна довжина мікропагона становила 1,5 см на поживному середовищі з концентрацією БАП 1,5 мг/л. У експлантів сорту Цверкеніг утворення конгломератів мікропагонів відбувалось на середовищах з концентрацією 1,5; 0,5; 0,75 мг/л БАП, мікропагони досягали максимально 2,76 см на середовищі з 1,0 мг/л БАП. У сорту Бебі Бантінг утворення конгломератів мікропагонів відбувалось на всіх варіантах середовищ. Формування адвентивних мікропагонів у конгломераті досягало 10 шт. на середовищі з 1,5 мг/л БАП і 12 шт. на середовищі з 0,5 мг/л БАП.

Через 6 тижнів спостереження всі експланти сорту Бігуді розвивалися, і утворення конгломератів мікропагонів відбулося на середовищах з 1,5; 2,0; 3,0 мг/л БАП. Однак на середовищі з 3,0 мг/л БАП на мікропагонах відмічали дуже дрібні листки, максимальна кількість адвентивних пагонів у конгломераті досягала 14 шт. на середовищі з концентрацією БАП 2,0 мг/л і 13 шт. – на контрольному середовищі. У сорту Мальчик-с-Пальчик 100 % утворення конгломератів мікропагонів відбувалось на середовищах з концентрацією БАП 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 1,5 мг/л, при цьому листки розвивалися дуже дрібні, світло-зеленого кольору, максимальна кількість додаткових мікропагонів у конгломераті досягла 16 шт. на середовищі з 3,0 мг/л БАП. Разом з тим у експлантів сорту Мандарин не відбувалось утворення конгломератів мікропагонів на середовищах з 0,75 та 1,0 мг/л БАП, листки були деформовані. Всі інші експланти сорту Мандарин утворювали велику кількість листків (максимально до 5–6 розгорнутих листків) на середовищі з 1,0 і 2,0 мг/л БАП.



а

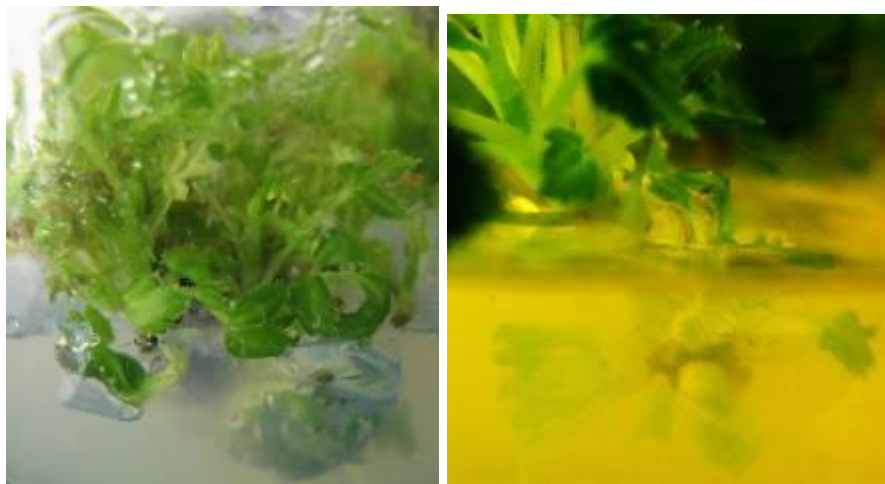
б

Рис. 1. Утворення конгломератів мікропагонів у сортів Мандарин (а) і Мальчик-с-Пальчик (б) через 3 тижні культивування на поживному середовищі з 3,0 мг/л БАП

2. Зміни морфологічних ознак адвентивних пагонів сортів мініатюрних троянд при культивуванні *in vitro* протягом 6 тижнів

Сорт	Концентрація БАП, мг/л	Морфологічні ознаки		
		Кількість утворених адвентивних пагонів на експлант, шт.	Збільшення довжини адвентивних пагонів, см	Кількість розгорнутих листків на адвентивний пагін, шт.
Рулеті	1,5	16,9±0,6	0,3±0,4	2,9±0,4
Цверкеніг	0,75	20,0±0,36	1,38±0,6	2,0±0,27
Бєбі Бантінг	2,0	10,0±0,75	0,24±0,02	4,9±0,74
Бігуді	2,0	14,0±0,67	0,09±0,01	14,0±0,67
Мальчик-с-Пальчик	3,0	16,0±0,75	5,6±0,46	0,34±0,05
Мандарин	1,0	16,1±0,48	0,13±0,02	7,0±0,8

Через 9 тижнів розвитку на середовищі з концентрацією 0,5 мг/л БАП у експлантів сорту Рулеті спостерігали розвиток пагонів усередину середовища (рис. 2,а). У експлантів сорту Цверкеніг ріст пагонів усередину середовища відбувався на середовищах з 1,0; 2,0; 3,0 мг/л БАП (рис. 2,б). Крім того, відмічали спонтанне утворення коренів у мікропагонів та мікроживців на середовищі з 0,75 мг/л БАП. У сорту Бєбі Бантінг спостерігали пригнічення розвитку конгломератів мікропагонів на середовищі з 0,5 мг/л БАП. Пригнічення розвитку конгломератів відзначали також у сорту Бігуді на всіх варіантах середовищ. Так, 33 % і 39 % конгломератів розвинулися на середовищі з 2,0 мг/л і 3,0 мг/л БАП відповідно, у решти конгломератів відбувалося відмирання мікропагонів і розвиток лише окремих адвентивних мікропагонів.



а **б**

Рис. 2. Розвиток мікропагонів усередину середовища:
а – сорт Рулеті; б – сорт Цверкеніг

Разом з тим на середовищі з 3,0 мг/л БАП у сорту Мальчик-с-Пальчик частота утворення конгломератів мікропагонів досягала 100 %, однак листки були дрібні (до 5–6 розгорнутих листків на один мікропагін). У експлантів сорту Мандарин частота утворення конгломератів мікропагонів складала 100 % (рис. 3).

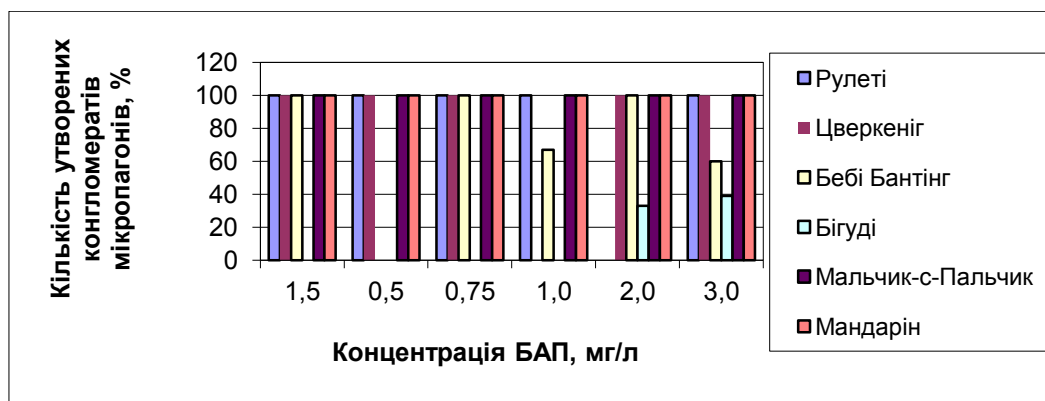


Рис. 3. Вплив БАП на утворення конгломератів мікропагонів
6 сортів мініатюрної троянди при культивуванні *in vitro*
протягом 9 тижнів

Висновки

Визначено оптимальні концентрації БАП для індукції пагоноутворення у 6 сортів садової групи мініатюрних троянд. Показано оптимальні терміни культивування цих сортів на середовищі з додаванням БАП для активного формування адвентивних мікропагонів. Відмічено високий відсоток утворення додаткових мікропагонів у сорту Рулеті на середовищі з концентрацією БАП 1,5 мг/л. Виявлено, що на середовищі з 1,0 мг/л БАП після 6 тижнів культивування у сорту Цверкеніг відбувається активне адвентивне пагоноутворення.

Список літератури

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология растений / Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
2. Введение в культуру *in vitro* перспективных сортов роз различных садовых групп для создания растущих коллекций / О.П. Мовчан, И.В. Митрофанова, З.К. Клименко, В.Д. Работягов // Бюлл. Никит. ботан. сада. – 2006. – Вып. 92. – С. 9-12.
3. Клименко З.К. Розы / З.К. Клименко. – М.: ЗАО «Фитон», 2001. – 176 с.
4. Кондратенко О.В. Особенности клонального микроразмножения двух сортов миниатюрных роз / О.В. Кондратенко, И.В. Митрофанова // Бюлл. Никит. ботан. сада. – 2002. – Вып. 86. – С. 38-40.
5. Кондратенко О.В. Микроразмножение миниатюрных роз *in vitro* / О.В. Кондратенко, О.В. Митрофанова // Ученые записки Таврического ун-та им. В.И. Вернадского. Серия: Биология. – 2001. – Т. 14, №1. – С. 109-114.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия: учеб. пособие для биол. спец. Вузов / Г.Ф. Лакин. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
7. Митрофанова О.В. Биотехнологические аспекты освобождения от вирусов и клонального микроразмножения некоторых экономически важных многолетних культур / О.В. Митрофанова, А.П. Михайлов, А.В. Чехов // Сб. трудов Никит. ботан. сада. – 1997. – Т. 119. – С. 7-34.
8. Ozel C.A. Efficient micropropagation of english shrub rose “Heritage” under *in vitro* condition / C.A. Ozel, O. Arslan // Intl. J. Agri. Biol. – 2006. – V. 8, №5. – P. 626-229.
9. Kanchanapoom K. *In vitro* Flowering from Cultured Nodal Explants of Rose (*Rosa hybrida* L.) / K. Kanchanapoom, N. Posayapisit, K. Kanchanapoom // Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj. – 2009. – V. 37, №2. – P. 261-263.
10. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15, № 3. – P. 437-497.

Определены оптимальные концентрации БАП для индукции побегообразования у 6 сортов садовой группы миниатюрных роз. Показаны оптимальные сроки культивирования 6 сортов миниатюрных роз на среде с добавлением БАП для активного адвентивного побегообразования.

Роза, морфогенез, вегетативная почка, культура in vitro

Thus, the optimal concentrations of BAP for the shooting induction in 6 cultivars of garden groups of miniature roses have been identified. The optimal terms of culture in 6 cultivars of miniature roses on medium supplemented with BAP for active adventives shooting have been shown.

Rose, morphogenesis, vegetative bud, culture in vitro