

3-бөлім  
**БИОТЕХНОЛОГИЯ**

---

Раздел 3  
**БИОТЕХНОЛОГИЯ**

---

Section 3  
**BIOTECHNOLOGY**

**Толембетова А.К.<sup>1</sup>, Турашева С.К.<sup>2</sup>, Иманбаева А.А.<sup>4</sup>,  
Ерназарова Г.И.<sup>5</sup>, Серикова З.Б.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>студентка магистратуры, e-mail: tulembetova56@bk.ru

<sup>2</sup>кандидат биологических наук, доцент, e-mail: svetlana.turasheva@kaznu.kz

<sup>3</sup>кандидат биологических наук, доцент, e-mail: gulzira.yernazarova@kaznu.kz

<sup>4</sup>студентка бакалавриата

Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

<sup>5</sup>кандидат биологических наук, Мангышлакский экспериментальный ботанический сад,

Казахстан, г. Актау, e-mail: imangarden@mail.ru

**МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ  
КОММЕРЧЕСКИХ СОРТОВ РОЗ *IN VITRO***

С целью размножения посадочного материала гибридных и коммерческих сортов роз казахстанской селекции, адаптированных к аридным регионам Западного Казахстана была использована технология микроклонального размножения *in vitro*. Для введения гибридных и сортовых роз в культуру *in vitro* узловыи сегменты с пазушными почками, а также сегменты междоузлий, взятые с растений, активно вегетирующих в Мангышлакском экспериментальном ботаническом саду изолировали в асептических условиях. Стерилизация путем обработки эксплантов 10% раствором перекиси водорода в течение 8 минут оказалась наиболее эффективной, по сравнению с обработкой эксплантов в 70% этаноле (20 сек.) и последующей 5-минутной экспозицией в 5% гипохлориде натрия. При использовании такого способа дезинфекции выход жизнеспособных эксплантов был максимальным и составлял 68,4%. Клонирование роз осуществлялось на различных вариантах модифицированной по фитогормонам питательной среде Мурасиге-Скуга. Наибольшее количество микроклонов образовывалось на среде МС, содержащей 3 мг/л БАП и 0,5 мг/л 2,4-Д. В качестве антиоксиданта в состав среды МС было добавлено 0,5 мг/л аскорбиновой кислоты. Для укоренения микрочеренков применялась среда МС с 2 мг/л ИУК. Коэффициент размножения при таких условиях равнялся 4. Данный оптимизированный протокол рекомендуется для интродукции декоративных гибридных и коммерческих сортов роз, для дальнейшего озеленения прикаспийского региона.

**Ключевые слова:** роза (*Rosa L.*), микроклональное размножение, *in vitro*, регуляторы роста.

Tolembetova A.K.<sup>1</sup>, Turasheva S.K.<sup>2</sup>, Imanbaeva A.A.<sup>4</sup>,  
Ernazarova G.I.<sup>5</sup>, Serikova Z.B.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>master student, e-mail: tulembetova56@bk.ru

<sup>2</sup>candidate of biological sciences, associate professor, e-mail: svetlana.turasheva@kaznu.kz

<sup>3</sup>candidate of biological sciences, associate professor, e-mail: gulzira.yernazarova@kaznu.kz

<sup>4</sup>bachelor student

Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

<sup>5</sup>candidate of biological sciences, Mangishlak experimental botanic garden,

Kazakhstan, Aktau, e-mail: imangarden@mail.ru

**Microclonal propagation *in vitro* of commercial varieties of rose**

To propagate the seedling of hybrid and commercial varieties roses of Kazakhstan breeding, adapted to the arid regions of Western Kazakhstan, the microclonal propagation *in vitro* technology was used. For introduce hybrid roses in *in vitro* culture, the nodal segments with axillary buds, as well as the internode segments taken from plants actively growing in Mangishlak experimental botanic garden, were isolated in aseptic conditions. Sterilization by treating the explants with a 10% solution of hydrogen peroxide for

8 minutes was the most effective, than its treatment by 70% ethanol (20 sec.) and subsequent 5-minute exposure in 5% sodium hypochlorite. Due to this method of disinfection, the yield of viable explants was maximal – 68.4%. Cloning of roses was carried out on different variants of Murashige-Skug medium modified by phytohormones. The greatest number of microclones was obtained on MS medium containing 3 mg/l BAP and 0.5 mg/l NAA. Ascorbic acid (0.5 mg/l) was added into MC medium as an antioxidant. For rooting was used MC medium with 2 mg/l IAA. The multiplication rate in this case was 4. This optimized protocol is recommended for the introduction of commercial varieties of roses, as well as for gardening of the Caspian region.

**Key words:** rose (Rose L.), microclonal propagation, in vitro, plant growth regulators

Толембетова Ә.Қ.<sup>1</sup>, Турашева С.К.<sup>2</sup>, Иманбаева А.А.<sup>3</sup>,  
Ерназарова Г.И.<sup>4</sup>, Серикова З.Б.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>магистратура студенті, e-mail: tulembetova56@bk.ru

<sup>2</sup>биология ғылымдарының кандидаты, доцент, e-mail: svetlana.turasheva@kaznu.kz

<sup>4</sup>биология ғылымдарының кандидаты, доцент, e-mail: gulzira.yernazarova@kaznu.kz

<sup>5</sup>бакалавриат студенті,

әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>3</sup>биология ғылымдарының кандидаты, Маңғыстау эксперименталдық ботаникалық бағы,  
Қазақстан, Ақтау қ., e-mail: imangarden@mail.ru

### Раушангүлдің коммерциялық сұрыптарын *in vitro* микроклондық көбейту

Батыс Қазақстанның құрғақ аймақтарына бейімделген раушангүлдердің будан және коммерциялық сұрыптарының көшет материалдарын көбейту мақсатында, *in vitro* микроклондық көбейту технологиясы қолданылды. Маңғышлақ эксперименталдық ботаникалық бағында өсіп жатырған раушангүлдердің қолтық бүршік бар бұтақ сегменттері мен буынаралық сегменттерін, асептикалық жағдайда сұрыптарды және гибридтіраушангүлдерді *in vitro* жағдайда енгізу үшін оқшаулап алынды. Эксплантты 70% этанол (20 секунд) және 5% натрий гипохлоридімен (5 минут) өңдеумен салыстырғанда, 8 минут бойы 10% сутек асқын тотығы ерітіндісімен зарарсыздандыру ең тиімді болды. Бұл әдісті қолданған кезде экспланттың өмір сүру шығуы максималды болды және 68,4% құрады. Раушангүлдердің клондық көбеюі фитогормондармен өзгертіп модифицирленген Мурасиге-Скуг (МС) қоректік ортасының әртүрлі нұсқаларында жүзеге асырылды. Микроклондардың ең көп саны 3 мг/л БАП және 0,5 мг/л 2,4-Д құрайтын МС ортасында құрылды. Антиоксидант ретінде МС ортасына 0,5 мг/л аскорбин қышқылы қосылды. Микробұтақтарды тамырландыру үшін 2 мг/л ИСҚ қосылған МС ортасы пайдаланылды. Осындай жағдайларда көбейту коэффициенті 4-ті құрады. Бұл оңтайландырылған регламент Каспий аймағын одан әрі көгалдандыру үшін сәндік гибридті және раушангүлдердің коммерциялық сұрыптарын енгізу үшін ұсынылады.

**Түйін сөздер:** раушангүл (Rosa L.), микроклондық көбейту, *in vitro*, өсу реттегіштері.

## Введение

В последнее время в связи с ростом числа городов и новостроек в Западном и Центральном Казахстане появляется необходимость в создании зеленых насаждений, из которых формируются скверы, парки, аллеи и групповые посадки. Для озеленения территории в общественных местах используются хвойные и лиственные деревья, кустарники, а также большое разнообразие цветочных декоративных растений, которые выполняют не только эстетическую функцию, но и создают определенный микроклимат. Из-за сурового климата, крайне неблагоприятного для роста и развития растений (резкие перепады температур, высокая солнечная инсоляция в сочетании с засоленностью почв и дефицитом влаги) Западный Казахстан от-

личается ограниченным составом аборигенной дендрофлоры и декоративной растительности, что обуславливает необходимость интродукции и акклиматизации растений для дальнейшего проведения озеленительных работ. В вопросах зеленого строительства в рамках национальной программы «Жасыл ел» в аридных зонах прикаспийского региона крупные цветоводческие хозяйства и экспериментальные ботанические сады отдают предпочтение розам, в частности, наиболее ценным сортам чайно-гибридных, полуплетистых и роз, принадлежащих к садовой группе флорибунда. Большинство сортов роз традиционно размножается черенками, прививается на рассаду или клональные подвои. Однако прививка является дорогостоящей процедурой, и традиционное разведение является трудоемким процессом. Биотехнология стала одной из

альтернатив традиционным методам размножения роз (Nitish K., 2011: 61-72). **Повышение эффективности селекционной и семеноводческой работы** связано с использованием клеточных технологий и, в частности, микроклонального размножения *in vitro*. Этот метод позволяет в короткие сроки размножить уникальные генотипы (отдаленные гибриды, селекционные образцы, формы, полученные с использованием биоинженерных приемов) и ускорить внедрение новых сортов в производство (Ruzic D., 2006: 149-153, Saxena G., 2000: 133-140). **Важным преимуществом микроклонального размножения** является то, что посадочный материал, получаемый этим методом, генетически идентичен давшему ему начало растению. По сравнению с традиционными методами данный биотехнологический метод позволяет получать оздоровленный от грибных и бактериальных патогенов, вирусных, микоплазменных и нематодных инфекций посадочный материал, а также достичь высокого коэффициента размножения, т.к. при клональном микроразмножении можно получить до 100 000 клонов в год, тогда как при обычном – всего 50-100 растений за тот же срок (Das P., 2010: 70-78, Pratar K.P., 2006: 94-114). Немаловажным является также и возможность сокращения продолжительности селекционного процесса, клеточные технологии позволяют проводить работы в течение года, независимо от климатических условий и экономить площади, необходимые для выращивания посадочного материала. Высокая экономическая эффективность технологии показана во многих европейских странах, которые удовлетворяют ежегодно растущий коммерческий спрос на декоративные цветочные растения, используя метод микроклонального размножения для массового тиражирования посадочного материала декоративных растений (Kim S.W., 2009: 199-203, Khosravi P., 2007: 100-104, Nak-Udom N., 2009: 583-586). В Казахстане ландшафтный дизайн и разведение коммерческих сортов декоративных цветочных растений развиты слабо ввиду отсутствия рентабельной и универсальной технологии, основанной на регламенте массового тиражирования и быстрого воспроизводства качественного посадочного материала декоративных растений, которая являлась бы альтернативой обычным трудоемким методам размножения. Данная статья посвящена разработке эффективных способов ускоренного размножения гибридов и коммерческих сортов роз казахстанской селекции на основе метода микроклонального размножения *in vitro*.

## Материалы и методы исследования

Объектами исследования являлись коммерческие сорта роз казахстанской селекции: «Колхозница», «Былина», «Казахстанская Юбилейная», «Алма-Атинская ароматная», «Ак-ку». Исходный материал собран весной с опытного участка Мангышлакского экспериментального ботанического сада (МЭБС) в период активной вегетации.

Данные сорта характеризуются следующими свойствами:

*Колхозница* – авторы сорта К.Л. Сушков, М.В. Бессчетнова, 1959. ВМЭБС с 1980 г. получены из Главного ботанического сада г. Алматы. В коллекции 12 экз. Кусты роз высокие, до 1 м высоты, здоровые, листья крупные, кожистые. Бутоны длинные, острые. Цветки розовые с лиловатыми оттенками, крупные (11-12 см), махровые (до 45 лп.), душистые, большей частью одиночные. Цветение обильное, продолжительное время сохраняют декоративность. Зимостойкость средняя, слабо поражается мучнистой росой. Сорт замечателен яркой окраской цветка, устойчивостью в срезе. Рекомендуются для массового озеленения.

*Былина* – авторы сорта К.Л. Сушков, М.В. Бессчетнова, 1961. В МЭБС с 1979 г. получены из Главного ботанического сада г. Алматы. В коллекции 17 экз. Кусты роз сильнорослые, до 1 м высоты, густые, молодые побеги пурпуровые с лиловым оттенком. Листья крупные, темно-зеленые, молодые листья пурпуровые. Бутоны овальные, распускаются медленно. Цветки светло-лилово-красные, пышные, с красивой раскладкой лепестков, высоким центром, крупные (10-13 см), махровые (40 лп.), со слабым специфическим ароматом, в соцветиях по 3-7, на прочных цветоносах. Цветение дружное и продолжительное. Зимостойкий. Не поражается грибными болезнями. Перспективен для срезки и групп.

*Казахстанская Юбилейная* – авторы сорта К.Л. Сушков, М.В. Бессчетнова, 1958. В МЭБС привлечен в 1985 г. из Главного ботанического сада г. Алматы. В коллекции 30 экз. Кусты невысокие, 65-75 см высоты, листья крупные, темно-зеленые, молодые пурпуровые. Бутоны длинные, острые, распускаются медленно. Цветки темно-красные, с черно-бархатистым оттенком, крупные (10-14 см), махровые (до 60 лп.), со слабым ароматом, большей частью одиночные. В сильную жару выгорает. Зимостойкость средняя. Слабо поражается мучнистой росой. Сорт

хорош для групповых посадок, среза и выгонки.

*Алма-Атинская Ароматная* – авторы сорта К.Л. Сушков, М.В. Бессчетнова, 1959. В МЭБС с 1979 г. получены из Главного ботанического сада г. Алматы. В настоящее время в коллекции 11 экз. Кусты роз сильнорослые, 70-80 см высоты, прямые. Листья крупные, кожистые. Бутоны длинные. Цветки светло-розовые с желтизной, на обороте лилово-розовые, чашевидные, крупные (10-13 см), густомахровые (до 80 лп.), душистые, большей частью одиночные. Цветение умеренное до обильного. Зимостойкий, устойчив к грибным болезням. Сорт перспективен для декоративного оформления и срезки.

*Ак-ку* – сорт получен из Иссыкского дендрария, в МЭБС с 2006 г. В коллекции 23 экз. Кусты роз невысокие, 65-73 см высоты, плотные, хорошо облиственные, листья некрупные, блестящие. Бутоны овальные. Цветки бархатисто-красные, средней величины (8-9 см), махровые (37-43 лп.), с тонким ароматом, устойчивый, не выгорает в жару. Цветение обильное, зимостойкий. Рекомендуются для срезки и групповых посадок (Бессчетнова М.В., 1979: 120).

Обязательным условием микроклонального размножения является использование эксплантов, полностью сохраняющих генетическую стабильность. Этому условию удовлетворяют почки органов стеблевого происхождения. Для использования метода микроклонального размножения, основанного на активации пазушных почек, с активно вегетирующими растениями отбирали узловые сегменты с пазушными почками и сегменты междоузлий. Побеги предварительно разрезали на фрагменты длиной 3-4 см, промывали мыльным раствором в течение 5-6 минут, проточной водой и затем несколько раз ополаскивали дистиллированной водой.

Для поиска оптимального режима стерилизации были применены одно- и двуступенчатые варианты стерилизации, различающиеся по времени обработки и типом стерилизующего агента. В первом случае, экспланты стерилизовали путем обработки 10% раствором перекиси водорода в течение 8 минут. Во втором случае, экспланты погружали на 20 секунд в 70% этанол, затем на 20 минут в 5% раствор гипохлорида натрия. После стерилизации растительный материал многократно промывали стерильной дистиллированной водой, обрезали сегменты, содержащие пазушные почки до 1-1,5 см и вертикально помещали на твердую питательную среду Мурасиге-Скуга (МС) (Murashige T., 1962: 473-497). Скрининг зараженных эксплантов про-

водили каждые 3 дня. Эффективность режима стерилизации оценивали по максимальному выходу жизнеспособных эксплантов на 15 сутки культивирования.

В технологии массового размножения растений *in vitro* решающую роль играет состав питательной среды и, в частности, гормональный состав (Smith R.H., 2000: 31-46). С целью подбора универсальной питательной среды, обеспечивающей высокий выход микрочеренков (регенерантов) для всех исследуемых сортов роз, было изучено 10 вариантов сред с разными комбинациями и концентрациями фитогормонов: бензиламинопурин (БАП), нафтилуксусной кислоты (НУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д). В качестве антиоксиданта в питательную среду вносили аскорбиновую кислоту (АК) и активированный уголь (АУ). Контролем являлась стандартная безгормональная среда МС (таблица 1).

**Таблица 1** – Модифицированный по фитогормонам состав питательной среды МС, использованной на этапе микроклонального размножения различных сортов роз

Вариант питательной среды	Состав питательной среды
1 (контроль)	Без фитогормонов
2	0,1 мг/л БАП + 1 мг/л НУК
3	0,5 мг/л БАП + 0,1 мг/л НУК
4	1 мг/л БАП + 0,1 мг/л НУК
5	3 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК
6	3 мг/л БАП + 0,5 мг/л 2,4-Д
7	3 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК + 0,5 мг/л АУ
8	3 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК + 0,5 мг/л АК
9	3 мг/л БАП + 0,5 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л АУ
10	3 мг/л БАП + 0,5 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л АК
Примечание: АУ – активированный уголь; АК – аскорбиновая кислота	

рН среды доводили до 5,6-5,8. Для каждого варианта использовали трехкратную повторность.

Экспланты культивировали на свету (интенсивность освещения составляла 5 тыс.лк) с 16 часовым фотопериодом. Температуру поддерживали в интервале 20<sup>0</sup>-25<sup>0</sup> С при 70% влажности воздуха. Укоренение микрочеренков осуществлялось на среде МС, содержащей 2 мг/л ИУК.

Полученные экспериментальные данные подвергались статистической обработке с помощью программ для статанализа.

### Результаты исследования и их обсуждение

Клональное микроразмножение состоит из ряда последовательных этапов, каждый из которых имеет свою специфику. Этапы клонального микроразмножения: отбор подходящих эксплантов, их стерилизация и перенос на питательную среду; собственно микроразмножение; укоренение побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям; выращивание растений в условиях теплицы и подготовка их к посадке в поле (Зонтиков Д.Н., 2011: 56-63).

При выборе экспланта необходимо учитывать как вид растения, так и метод микроразмножения, который будет использоваться. В большинстве случаев верхушечные, пазушные и цветочные почки и побеги с меристематическими тканями узлов используют для получения и размножения побегов в культуре *in vitro*. В то время как, листья, корни, лепестки чаще применяют для получения каллусной ткани и перевода ее в суспензионную культуру или индукции соматического эмбриогенеза (Мухамбетжанов С.К., 2010: 41-52, Сапаргали О., 2010: 341-343). Успех введения в культуру часто определяется эффективностью стерилизации. Поверхностные покровы 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. Известно, что эффективность освобождения от контаминантов биологической природы зависит от способа и продолжительности стерилизации (Мухамбетжанов С.К., 2011: 45-48, Krosh-Khui M., 2006: 514-527, Candi F.A., 2009: 167-183).

Для поверхностной дезинфекции растительного материала применяют широкий набор химических реагентов как по отдельности, так и в комплексе друг с другом. При этом, выбор стерилизующего агента определяется особенностями экспланта. В данном исследовании нами были использованы узловыи сегменты с пазушными почками и сегменты междоузлий пяти различных сортов роз. Результаты исследований показали, что наиболее эффективным способом стерилизации оказалась одноступенчатая стерилизация 10% раствором перекиси водорода (таблица 2).

Количество неинфицированных и жизнеспособных стеблевых сегментов с пазушными почками при стерилизации 10% раствором перекиси водорода было в 1,3 раза больше, чем при стерилизации эксплантов 70% этанолом с последующей экспозицией их в гипохлориде натрия и составляло 68,4 %, соответственно.

Следующим этапом технологии является собственно размножение *in vitro* – культивирование на питательной среде для массового получения микрклонов. 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*. Обычно состав питательной среды подбирают для каждого сорта роз. Для выращивания роз в стерильных условиях используют питательные среды Мурасиге и Скуга, Шенка-Хильдебранта, Гамборга-Эвелеге (B<sub>5</sub>), Кюрина-Лепойве, Неша, WPM и др. Выбор той или иной питательной среды обуславливается целями и задачами исследования (Das P., 2010: 70-78, Khosravi P., 2007: 100-104, Мухамбетжанов С.К., 2011: 45-48). В наших исследованиях базовой средой являлась питательная среда Мурасиге-Скуга, дополненная регуляторами роста в различных комбинациях и концентрациях.

На исследуемых вариантах сред наблюдалось образование каллусов и адвентивных побегов. Отсутствие в составе среды фитогормонов (контроль) приводило к каллусообразованию в культуре стеблевых эксплантов (75%). Наличие в среде фитогормонов с количественным преобладанием регуляторов роста ауксинового типа действия (2 вариант среды) индуцировало каллусогенез в большей степени, чем на средах с высокими концентрациями цитокининов. Так, например, на 20-й день культивирования эксплантов на среде МС, содержащей фитогормоны БАП и НУК в соотношении 10:1 частота каллусогенеза составляла 80%, а при соотношении 1:10 частота каллусогенеза увеличилась на 10 % и равнялась 90%, соответственно (таблица 3, рисунок 1а).

Следует заметить, что химическая природа ауксина также оказывает влияние на каллусообразование. В частности, при замене НУК на синтетический ауксин 2,4-Д (при неизменной концентрации) количество каллусов значительно уменьшается. Например, сравнивая результаты на 7 и 9 вариантах сред, при одинаковых

концентрациях и соотношениях цитокинина и ауксина, но различных видах ауксина видно, что в присутствии НУК процент каллусогенеза со-

ставлял 25%, тогда как на среде с 2,4-Д частота каллусогенеза составляла 9,09% т.е. 2,8 раза меньше.

**Таблица 2** – Влияние режима стерилизации на жизнеспособность эксплантов сортов роз в условиях *in vitro* \*

Способ стерилизации	Стерилизующий агент	Время экспозиции	Количество эксплантов шт.	Количество неинфицированных жизнеспособных эксплантов, %
Двухступенчатая стерилизация	70% этанол; 5% гипохлорид натрия	20 сек. 5 мин.	43,0±11,2	53,3
Одноступенчатая стерилизация	10% перекись водорода	8 мин.	34,0±9,7	68,4
Примечание: * средние значения для всех сортов				

**Таблица 3** – Частота каллусогенеза в культуре стеблевых эксплантов роз на различных вариантах модифицированной среды МС

Вариант	Состав питательной среды	Частота каллусогенеза, %
1	среда без гормонов	75,0
2	0,1 мг/л БАП + 1 мг/л НУК	90,0
3	0,5 мг/л БАП + 0,1 мг/л НУК	0
4	1 мг/л БАП + 0,1 мг/л НУК	80,0
5	3 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК	0
6	3 мг/л БАП + 0,5 мг/л 2,4-Д	6,7
7	3 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК + АУ	25,0
8	3 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК + 0,5 мг/л АК	0
9	3 мг/л БАП + 0,5 мг/л 2,4-Д + АУ	9,1
10	3 мг/л БАП + 0,5 мг/л 2,4-Д + АК	14,3
Примечание: АУ - активированный уголь; АК - аскорбиновая кислота		

Противоположная ситуация наблюдалась при индукции процессов геммогенеза. Приведенные результаты подтверждают положение о том, что высокое соотношение ауксин:цитокинин стимулирует процессы пролиферации соматических клеток и их дедифференциацию.

Поскольку целью исследований является размножение сортов роз генетически идентичных исходному растению, а каллусы представляют собой генетически неоднородный материал, поэтому дальнейшие работы были сфокусированы на индукции процессов побегообразования *in vitro*. Как было отмечено выше, преобладание в питательной среде цитокинина приводит к обра-

зованию побегов из пазушных почек, в частности ранее нами было исследовано влияние цитокинина БАП в соотношении с ауксинами равное 5:1. На варианте питательной среды, содержащей 0,5 мг/л БАП и 0,1 мг/л НУК наблюдается образование одиночных побегов, которые прорастали с частотой 64,2% (рисунок 1б). При увеличении соотношения БАП:НУК до 6:1, процент побегообразования уменьшался почти в 5 раз и составлял 13,33%. Однако добавление 0,5 мг/л антиоксиданта аскорбиновой кислоты приводило к возрастанию количества побегов до 25% (таблица 4). Положительное влияние антиоксиданта проявляется также и в том, что снижается

степень некроза тканей, вызванное фенольными соединениями, экскретируемыми и аккумулируемыми в питательной среде (рисунок 1с). Позитивная роль антиоксиданта аскорбиновой кислоты и активированного угля в нейтрализации метаболитов, ингибирующих рост и развитие клеток отмечается многими авторами (Malabadi R.B., 2005: 181-186, Stasolla C., 2006: 429-436, Roy P.K., 2004: 149-154).

Экспериментальные данные, приведенные в таблице 4, показывают, что использование фи-

тогормона 2,4-Д вместо НУК приводит к множественному побегообразованию (таблица 4, рисунок 2). Регенерация побегов на среде с 3 мг/л БАП и 0,5 мг/л 2,4-Д происходит с частотой 10%, а при добавлении аскорбиновой кислоты – увеличивается до 25%. При этом количество побегов на эксплант составляет 4 и 90% побегов прорастают. Таким образом образование множества адвентивных побегов в расчете на один эксплант повышает коэффициент размножения, и в целом, эффективность технологии.



а – каллусогенез в культуре стеблевых эксплантов роз;  
 б – образование одиночных побегов роз в культуре *in vitro* на среде с 0,5 мг/л БАП и 0,1 мг/л НУК;  
 с – некроз тканей стеблевых сегментов с пазушными почками на среде без антиоксидантов.

**Рисунок 1** – Образование каллусов и одиночных побегов в культуре пазушных почек роз на различных вариантах питательной среды МС

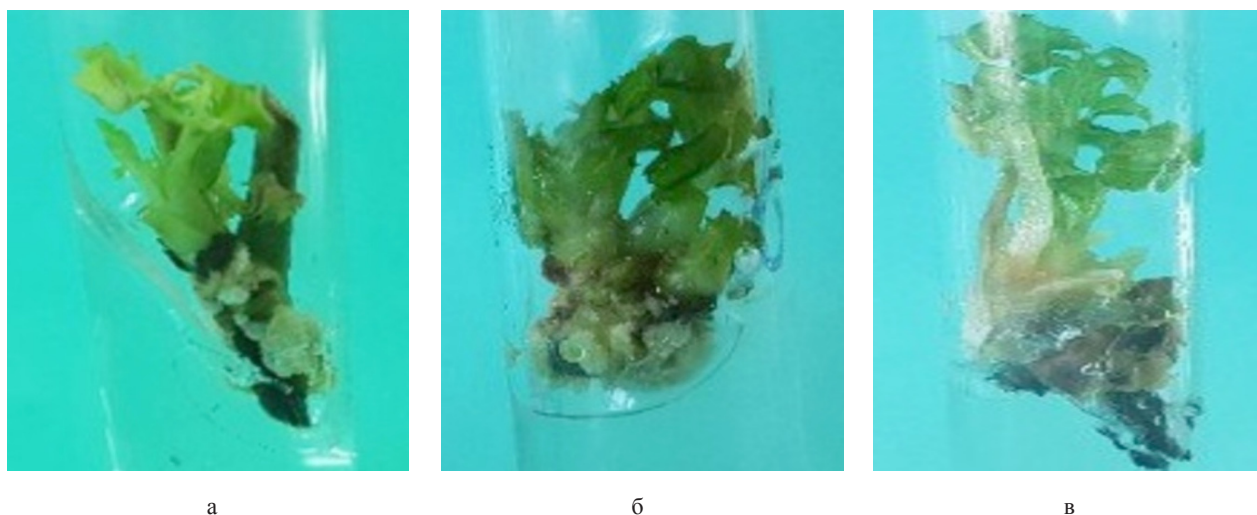
**Таблица 4** – Частота побегообразования в культуре пазушных почек роз на различных вариантах среды МС (средние значения для исследуемых сортов роз)

Варианты	Варианты питательных сред	Частота побегообразования, %
1	Без фитогормонов	0
2	0,1 мг/л БАП + 1 мг/л НУК	0
3	0,5 мг/л БАП+ 0,1 мг/л НУК	64,2±13,3
4	1 мг/л БАП +0,1 мг/л НУК	0
5	3 мг/л БАП+ 0,5 мг/л НУК	13,3±6,1
6	3 мг/л БАП+ 0,5 мг/л 2,4-Д	10,0±3,6
7	3 мг/л БАП +0,5 мг/л НУК+0,5 мг/л АУ	0
8	3 мг/л БАП+ 0,5 мг/л НУК + 0,5 мг/л АК	25,0±12,0
9	3 мг/л БАП+ 0,5 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л АУ	12,1±3,8
10	3 мг/л БАП+ 0,5мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л АК	25,0±8,3
Примечание: АУ- активированный уголь; АК-аскорбиновая кислота		



Эксперимент, оценивающий действие цитокинина БАП, присутствующего в среде МС на размножение пазушных побегов, показал, что наибольшая скорость размножения побегов (4 побега на один регенерирующий эксплант) были по-

лучена для сорта розы «Колхозница», когда концентрация регуляторов роста в среде составляла 3 мг/л БАП+ 0,5 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л АК. Наивысшее соотношение цитокинина к ауксину 2,4-Д в среде индуцировало размножение побегов.



**Рисунок 2** – Адвентивное побегообразование в культуре пазушных почек роз сортов Колхозница (а), Былина (б), Ак-ку (в) на питательной среде МС, содержащей 3 мг/л БАП, 0,5 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л АК

В отношении генотипов, наибольшей отзывчивостью к органогенезу *in vitro* обладал сорт розы «Колхозница», затем по убывающей следуют сорта «Былина», «Казахстанская Юбилейная» которые характеризуются частотой побегообразования 98% и 80%, соответственно. Процент побегообразования у сортов «Ак-ку» и «Алма-Атинская ароматная» составил 60% и 30% (таблица 5). Регенерация побегов у всех исследуемых сортов роз, кроме сорта «Казахстанская Юбилейная» происходила на 10 варианте среды МС, содержащей 3 мг/л БАП, 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л АК, а для сорта «Казахстанская Юбилейная» оптимальной оказалась среда с тем же балансом регуляторов роста, но содержащая 0,5 мг/л активированного угля.

На этапе укоренения и высадки в грунт обычно изменяют основной состав среды. Уменьшают количество солей и углеводов, исключают цитокинины и добавляют ауксины (Мухамбетжанов С.К., 2011: 45-48). Выбор концентрации ауксинов, необходимых для нормального укоренения побегов зависит от ряда причин. Среди них отметим наследственную предрасположенность побегов к укоренению, обусловленную видовыми и сортовыми особенностями родительских растений, тип используемого ауксина, а также

концентрацию и соотношение фитогормонов на этапе размножения побегов. Эффективность ауксинов при укоренении побегов в значительной мере уменьшается под влиянием высоких доз цитокининов, вносимых в питательную среду на первом и втором этапах микроразмножения. Целесообразно при культивировании на первых этапах использовать среды сначала с более высокими, а затем – низкими концентрациями цитокининов.

**Таблица 5** – Частота побегообразования в культуре пазушных почек различных сортов роз на питательной среде, содержащей 3 мг/л БАП, 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л АК

№	Сорт	Частота побегообразования, %
1	Колхозница	98,0
2	Былина	80,0
3	Казахстанская Юбилейная	80,0
4	Ак-ку	60,0
5	Алма-Атинская ароматная	30,0

В данных исследованиях на этапе размножения нами были использованы высокие концентрации цитокинина БАП (3 мг/л), а в качестве источника ауксинов оптимальным оказалась 2,4-Д (0,5 мг/л). Однако образовавшиеся адвентивные побеги имели слаборазвитые корни, поэтому было предложено заменить ауксин 2,4-Д на функционально более активную форму ауксина – индолилуксусную кислоту в концентрации 2 мг/л. Таким образом соотношение цитокинин : ауксин на втором этапе культивирования составляло 6:1, а на этапе укоренения – 1,5:1. При таком балансе и типе регуляторов роста корешки удлинялись и развивались лучше, чем на среде с 2,4-Д, применяемого в качестве регулятора процесса ризогенеза.

### Заключение

В результате исследований был разработан протокол культивирования *in vitro* стеблевых сегментов, содержащих пазушные почки для коммерческих сортов роз казахстанской селекции. Установлен оптимальный режим поверхностной дезинфекции эксплантов и стерилизу-

ющий агент – 10% раствор перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) с экспозицией эксплантов в течение 8 минут. На питательной среде МС, дополненной 3 мг/л БАП, 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л аскорбиновой кислоты отмечено множественное образование побегов (до 4 побегов на эксплант). Культивирование эксплантов на данном варианте питательной среды обеспечивает высокую скорость и коэффициент размножения побегов *in vitro* для большинства сортов роз, что предопределяет высокую эффективность технологии микроклонального размножения растений. На этапе укоренения следует уменьшить соотношение регуляторов роста в сторону количественного преобладания ауксинов. Для развития корней микрочеренков розы целесообразно использовать ауксин ИУК в соотношении с БАП равным 1,5:1, соответственно 3 мг/л БАП и 2 мг/л ИУК. Данный регламент культивирования пазушных почек роз в условиях *in vitro* рекомендуется для массового размножения коммерческих сортов декоративных роз для озеленения прикаспийского региона Казахстана, а также для интродукции и пополнения коллекции розария Мангышлакского экспериментального ботанического сада.

### Литература

- 1 Nitish K., Reddy M. In vitro Plant Propagation: a review // Journal of Forest Science. – 2011. - Vol. 27. – P. 61-72.
- 2 Ruzic D., Lazic T. Micropropagation as means of rapid multiplication of newly developed blackberry and black currant cultivars // Agriculturae Conspectus Scientificus. – 2006. – Vol. 71. – P. 149-153.
- 3 Saxena G., Banerjee S., Rahman L., Mallavarapu G.R., Sharma S., Kumar S. An efficient in vitro procedure for micropropagation and generatio of somaclones of rose scented Pelargonium // Plant Science. – 2000. – Vol. 29. –P. 133-140.
- 4 Das P. Mass cloning of Rose and Mussaenda, popular garden plants, via somatic embryogenesis // Hort.Sci. -2010. – Vol. 37. –P. 70-78.
- 5 Pratar K.P., Siba P.R., Madhu Sh., Anil S., Paramvir S.A. In vitro propagation of rose - a review // Biotechnology Advances. – 2006. – Vol. 24. – P. 94-114.
- 6 Kim S.W., Oh M.J., Liu J.R. Somatic embryogenesis and plant regeneration in zygotic embryo explant cultures of rugosa rose // Plant Biotechnology Reports. -2009. - Vol. 3. - P. 199-203.
- 7 Khosravi P., Kermani M.J., Nematzadeh G.A., Bihamta M.R. A protocol for mass production of Rosa hybrid cv. Iceberg through in vitro propagation // Iranian J. of Biotechnology. – 2007. - Vol. 5. –P. 100-104.
- 8 Nak-Udom N., Kanchanapoom K., Kanchanapoom K. Micropropagation from cultured nodal explants of rose (Rosa hybrida L. cv. 'Perfume Delight') // Songklanakarin J. Sci. Technol. – 2009. – Vol. 31. –P. 583-586.
- 9 Бессчетнова М.В., Михнева Т.Н. Розы. – Алма-Ата: Кайнар. -1979. - 120 с.
- 10 Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. // Physiologia Plantarum. – 1962. – Vol. 15. – P. 473-497.
- 11 Зонтиков Д.Н., Зонтикова С.А. Особенности клонального микроразмножения декоративных сортов Rosa hybrid // Вестник КГУ им.Н.А.Некрасова – 2011. – № 5. –P. 56-63
- 12 Мухамбетжанов С.К., Нам С.В., Вечерко Н.А., Мурсалиева В.К. Факторы влияющие на рост и развитие роз *in vitro* // Биотехнология. Теория и практика. – 2010. - № 1. – С. 41-52.
- 13 Сапаргали О., Нам С.В., Вечерко Н.А., Мухамбетжанов С.К., Мурсалиева В.К. Влияние генотипа на микроклональное размножение роз // Сб. тр. междунар. конф. «Актуальные проблемы ботанического ресурсосведения», Алматы. - 2010. - С.341-343
- 14 Мухамбетжанов С.К., Мурсалиева В.К., Вечерко Н.А., Нам С.В. Оптимизация протоколов питательных сред для микроклонального размножения роз // Вестник КазНУ. Серия биологическая. – 2011. -№ 4. – С. 45-48.
- 15 Krosh-Khui M., De Silva J.A.T. In vitro culture of the Rosa species // Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology-2006. - Vol. 2. – P.514-527.

- 16 Candi F.A., Kazaz O. Biotechnology of roses: progress and future peospects // Suleyman Dermirel Univer. Orman Fakultesi Dergisi (Seri:A). -2009. - Vol.1. -P.167-183.
- 17 Malabadi R.B., Van Staden J. Role of antioxidants and amino acids on somatic embryogenesis of Pinus patula. // In Vitro Cellular and Developmental Biology: Plant. – 2005. - Vol. 41. – P. 181–186.
- 18 Stasolla C., Lam M.S.W., Yeung E.C. Exogenous applications of ascorbic acid enhance shoot apical meristem growth and induce shoot organogenesis in germinating white spruce Picea glauca somatic embryos // International Journal of Plant Sciences. – 2006. - № 167. – P. 429–436.
- 19 Roy P.K., Mamum A.N.K., Ahmed G. In vitro plantlets regeneration of rose // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2004. - Vol.14. - P.149-154.
- 20 Smith R.H. Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments. Academic Press. – 2000. - P. 31-46.

### References

- 1 Besschetnova M.V., Mikhneva T.N. (1979) Rosi [Roses]. - Alma-Ata: Kainar, 120 p.
- 2 Candi F.A., Kazaz O. (2009) Biotechnology of roses: progress and future peospects. Suleyman Dermirel Univer. Orman Fakultesi Dergisi (Seri:A, vol.1, pp. 167-183.
- 3 Das P (2010) Mass cloning of Rose and Mussaenda, popular garden plants, via somatic embryogenesis. Hort.Sci., vol. 37, pp. 70-78.
- 4 Khosravi P., Kermani M.J., Nematzadeh G.A., Bihamta M.R. (2007) A protocol for mass production of Rosa hybridacv. Iceberg through in vitro propagation. Iranian J. of Biotechnology, vol. 5, pp.100-104.
- 5 Kim S.W., Oh M.J., Liu J.R. (2009) Somatic embryogenesis and plant regeneration in zygotic embryo explant cultures of rugosa rose. Plant Biotechnology Reports, vol. 3, pp. 199-203.
- 6 Krosh-Khui M., De Silva J.A.T. (2006) In vitro culture of the Rosa species. Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology, vol. 2, pp. 514-527.
- 7 Malabadi R.B., Van Staden J. (2005) Role of antioxidants and amino acids on somatic embryogenesis of Pinus patula. In Vitro Cellular and Developmental Biology: Plant, vol. 41, pp. 181–186.
- 8 Mukhambetzhанov S.K., Mursalieva V.K., Vecherko N.A., Nam S.V. (2011) Optimizacia protokolov pitatelnih sred dlja mikroklonalnogo razmnozhenia roz [Optimisation of protocol of nutrient medium for microclonal propagation of rose] Bulletin of Kazakh National University. Experimental Biology, vol. 4, pp. 45-48.
- 9 Mukhambetzhанov S.K., Nam S.V., Vecherko N.A., Mursalieva V.K. (2010) Faktori vlijajushie na rost i razvitie roz in vitro [The factors influence on growth and development of rose in vitro]. Biotechnology: theory and practice, vol. 1, pp. 41-52.
- 10 Murashige T, Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, vol. 15, pp. 473-497.
- 11 Nak-Udom N., Kanchanapoom K., Kanchanapoom K. (2009) Micropropagation from cultured nodal explants of rose (Rosa hybrida L. cv. ‘Perfume Delight’) Songklanakarın J. Sci. Technol., vol. 31, pp. 583-586.
- 12 Nitish Kumar, Reddy M. (2011) In vitro Plant Propagation: a review. Journal of Forest Science, vol. 27, pp. 61-72.
- 13 Pratar Kumar Pati, Siba Prasad Rath, Madhu Sharma, Anil Sood, Paramvir Singh Ahuja (2006) In vitro propagation of rose - a review. Biotechnology Advances, vol. 24, pp. 94-114.
- 14 Roy P.K., Mamum A.N.K., Ahmed G. (2004) In vitro plantlets regeneration of rose. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, vol. 14, pp. 149-154.
- 15 Ruzic D., Lazić T. (2006) Micropropagation as means of rapid multiplication of newly developed blackberry and black currant cultivars. Agriculturae Conspectus Scientificus, vol. 71, pp. 149-153.
- 16 Sapargali O., Nam S.V., Vecherko N.A., Mukhambetzhанov S.K., Mursalieva V.K. (2010) Influence of the genotype on the microclonal propagation of roses. Abstracts of international conference "Actual problems of botanical research", Almaty, pp. 341-343.
- 17 Saxena G., Banerjee S., Rahman L., Mallavarapu G.R., Sharma S., Kumar S. (2000) An efficient in vitro procedure for micropropagation and generatio of somaclones of rose scented Pelargonium. Plant Science, vol. 29, pp. 133-140.
- 18 Smith R.H. (2000) Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments. Academic Press, pp. 31-46.
- 19 Stasolla C., Lam M.S.W., Yeung E.C. (2006) Exogenous applications of ascorbic acid enhance shoot apical meristem growth and induce shoot organogenesis in germinating white spruce Picea glauca somatic embryos. International Journal of Plant Sciences, vol. 167, pp. 429–436.
- 20 Zontikov D.H., Zontikova S.A. (2011) Osobennosti klonalnogo microrazmnozhenia dekorativnih sortov Rosa hybrid [Features of clonal micropropagation ornamental varieties of Rosa hybrid]. Byulleten KGU imeni N.A.Nekrasova, vol. 5, pp. 56-63.