

- 6 Zhang B., Pan X., Cobb G.P., Anderson T.A. *Plant microRNA: A small regulatory molecule with big impact* // *Developmental Biology*, 2006. Vol. 289. P. 3-16.
- 7 Fabian M.R., Sonenberg N., Filipowicz W. *Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs* // *Annu Rev Biochem*. 2010. Vol. 79. P. 351-79.
- 8 Kozlov G., Safaee N., Rosenauer A. et al. *Structural basis of binding of P-body associated proteins GW182 and Ataxin-2 by the Mle domain of poly(A)-binding protein* // *J Biol Chem*. 2010. 20181956
- 9 Wang Y.X., Zhang X.Y., Zhang B.F. *Initial study of microRNA expression profiles of colonic cancer without lymph node metastasis* // *J Dig Dis*. 2010. Vol. 11 (1). P. 50-4.
- 10 Galardi S., Mercatelli N., Farace M.G., Ciafre S.A. *NF- κ B and c-Jun induce the expression of the oncogenic miR-221 and miR-222 in prostate carcinoma and glioblastoma cells* // *Nucleic Acids Research*, 2011. Vol. 39. P. 3892-3902.
- 11 Latronico M.V.G., Catalucci D., Condorelli G. *Emerging role of microRNAs in cardiovascular biology* // *Circul. Res.*, 2007. Vol. 101. P. 1225-1236.
- 12 Alevizos I., Illei G.G. *MicroRNAs as biomarkers in rheumatic diseases* // *Nat Rev Rheumatol*. 2010. Vol. 6 (7). P.391-8
- 13 Cui W., Zhang Y., Hu N. et al. *miRNA-520b and miR-520e sensitize breast cancer cells to complement attack via directly targeting 3'UTR of CD46* // *Cancer Biol Ther*. 2010. Vol. 10 (3). P. 232-41
- 14 Fang Z., Rajewsky N. *The Impact of miRNA Target Sites in Coding Sequences and in 3'UTRs*. *PLoS One*. 2011. Vol. 6 (3). e18067
- 15 Ajay S.S., Athey B.D., Lee I. *Unified translation repression mechanism for microRNAs and upstream AUGs* // *BMC Genomics*. 2010. Vol. 5;11. (1). P. 155
- 16 Saini H., Enright A., Griffiths-Jones S. *Annotation of Mammalian Primary microRNAs* // *BMC Genomics*. 2008. Vol. 27;9. No. (1):564.

Тұжырым

Бұл жұмыста 784 генаралық miRNA-дың интронды miRNA кодтайтын 52 геннің mRNA-мен байланысу сайттары анықталды. Зерттелген miRNA-дың әрбір геннің mRNA-ның 5'UTR, CDS және 3'UTR-мен байланысу ерекшеліктері зерттелді.

Summary

Sites of interaction of 784 intergenic miRNAs with mRNAs of 52 genes coding intronic miRNAs are established. Features of interaction of observed miRNAs with mRNAs of each gene in 5'UTR, CDS and 3'UTR are revealed.

УДК 581.1.035

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

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛОВ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ РОЗ

(Институт биологии и биотехнологии растений)

Оптимизированы протоколы использования питательных для микроклонального размножения роз относящихся к разным садовым группам.

В последние годы в литературе появились обзоры, посвященные размножению роз путем клонирования *in vitro*, анализ которых показывает, что различные сорта роз имеют различную требовательность к составу питательных сред [1-3]. Проведенные собственные исследования выявили зависимость процессов получения миничеренков, их укоренения *in vitro* от правильного подбора питательных сред, протоколов их использования с учетом сортовых особенностей роз [4,5].

В настоящее время большинство исследований по клональному размножению коммерческих сортов роз направлено на оптимизацию состава питательных сред, особенно подбор оптимальных концентраций и комбинаций различных регуляторов роста [6-9].

Так, при введении в культуру нового сорта или даже экплантов разного происхождения одного и того же сорта возникают различные требования к подбору культуральной среды определенного состава. Часто для введения в культуру, выведения из состояния покоя экпланта и поддержания жизнеспособности может быть оптимальной среда одного состава, а для активизации роста и развития дополнительных побегов, индукции корнеобразования более эффективными будут другие.

Одной из сложностей на этапе введения в культуру роз является ингибирование ростовых процессов токсическими веществами (продуктами окисления фенолов) выделяемыми экплантом в питательную среду в результате травмы, полученной им при изолировании [1-3]. Одним из способов снижения влияния продуктов фенольного окисления является включение в питательную среду антиоксидантов и пассирование на свежую питательную среду исходного состава.

Введение в питательную среду ауксинов (НУК, ИМК) и цитокининов (БАП, кинетин, зеатин) в различных соотношениях оказывало положительное влияние на жизнеспособность экплантов, стимулировало

образование дополнительных почек и побегов у испытанных сортов роз, однако в некоторых случаях отмечено образование витрифицированных побегов с укороченными междоузлиями, что было не желательным для их дальнейшего тиражирования *in vitro* [1,2]. Известно, что гиббереллины (ГК) оказывают влияние на рост и вытягивание побегов, стеблей. В наших исследованиях внесение в питательную среду ГК стимулировало вытягивание междоузлий и приводило к формированию минипобегов с нормальной морфологией. Хорошо развитые миничеренки переносили на питательные среды, содержащие ИУК, 2,4-Д, БАП как по отдельности, так и в сочетаниях друг с другом для укоренения *in vitro*.

Несмотря на имеющиеся положительные результаты необходимы дальнейшие исследования по усовершенствованию состава питательных сред, последовательности их применительно к сорту, типу экспланта, задаче отдельного этапа. Целью настоящего исследования явилась оптимизация использования протоколов питательных сред для микроклонального размножения роз.

Материалы и методы

Объектом исследований явились коммерчески ценные сорта роз, относящихся к чайно-гибридным, плетистым, почвопокровным, миниатюрным группам садовых роз из коллекций Института биологии и биотехнологии растений и АО «Лесной питомник».

В качестве первичных эксплантов использовали пазушные почки активно вегетирующих побегов, выращенных *ex situ* растений, и меристемы (апексы) побегов, выращенных в условиях *in vitro*.

В работе пользовались общепринятыми в практике микроклонального размножения роз методами: стерилизации исходного материала, введения в культуру, собственно микроклонального размножения и укоренения *in vitro* [1-3].

Результаты и их обсуждение

Этап введения в культуру

Для введения в культуру *in vitro* пазушных почек и апексов побегов использовали твердые питательные среды МС или МСМ (для меристем), содержащие соли макро- и микроэлементов, витамины по прописи Мурасиге и Скуга [10] (Таблица 1).

Таблица 1 – Базовый состав питательных сред МС и МСМ применяемых на этапе введения в культуру

Компоненты питательной среды, мг/л			
Соли макроэлементов		Соли микроэлементов	
NH ₄ NO ₃	1650	H ₃ BO ₃	6,2
KNO ₃	1900	MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
KH ₂ PO ₄	170	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6
Витамины		Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
Тиамин (B ₁)	0,1	KJ	0,83
Пиридоксин (B ₆)	0,5	Железо-хелатный комплекс	
Никотиновая к-та (PP)	0,5	FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8
		Na ₂ ЭДТА·2H ₂ O	37,3

Для поддержания жизнеспособности эксплантов среды были дополнены: глицином (2 мг/л), аскорбиновой кислотой (2 мг/л), мезо-инозитом (100 мг/л), сахарозой (30 г/л).

Для индукции ростовых процессов в изолированных пазушных почках среда МС была дополнена ИУК (0,1; 0,5 мг/л), БАП (1,5; 3,0 мг/л), кинетином (0,1; 0,5; 1,5 мг/л).

Для индукции ростовых процессов в изолированных апексах побегов среда МСМ была дополнена БАП (0,5; 1,5; 4,0 мг/л), ИМК (0,1 мг/л), ИУК (0,1 мг/л), кинетином (2,0 мг/л), зеатином (0,25 мг/л), ГК (0,5 мг/л).

В обоих вариантах в качестве затвердителей среды вносили агар «Fluka» (5 г/л). До внесения агара pH среды доводили 1 Н растворами КОН или HCl до значения 5,7.

Готовые среды разливали в пробирки (по 8-10 мл в каждую), стерилизовали автоклавированием при температуре 121 °С в течение 20 мин.

Пробирки с эксплантами содержали в условиях световой комнаты при температуре 25±1 °С с 16-ти часовым фотопериодом в течение 2-4-х недель до образования розетки (конгломерат адвентивных почек и минипобегов).

Этап собственного микроклонального размножения

Для тиражирования полученных на этапе введения в культуру минипобегов использовали твердую питательную среду МСК, содержащую соли макро- и микроэлементов, витамины по прописи Мурасиге и Скуга.

Для поддержания роста минипобегов среда была дополнена: глицином (2 мг/л), аскорбиновой кислотой (2 мг/л), мезо-инозитом (100 мг/л), сахарозой (30 г/л).

Для пролиферации и стимуляции образования адвентивных побегов среда была дополнена ИМК (0,1 мг/л), БАП (1,0; 2,0 мг/л), ГК (2,0; 3,0 мг/л), агаром «Fluka» (5 г/л). До внесения агара pH среды доводили 1 Н растворами КОН или HCl до значения 5,7.

Готовую среду разливали в манжеты (по 20-30 мл в каждую), стерилизовали автоклавированием при температуре 121⁰С течение 20 мин.

Манжеты с розетками содержали в световой комнате при температуре 25±1⁰С с 16-ти часовым фотопериодом.

В течение 34-х недель осуществляли тиражирование мини побегов, для чего побеги отделяли от розеток, делили на сегменты с пазушными почками и с интервалом 4 недели пересаживали на свежую питательную среду исходного состава. Хорошо развитые мини побегов, полученные в результате ряда последовательных пассажей переносили на среду для укоренения *in vitro*.

Этап укоренения *in vitro*

Для укоренения *in vitro* использовали твердую питательную среду МСУ, содержащую ½ солей макро- и микроэлементов, витамины по прописи Мурасиге и Скуга (Таблица 2).

Среда была дополнена сахарозой (15 г/л), ИМК (0,1; 0,5; 1,0 мг/л), ИУК (0,5 мг/л), 2,4-Д (0,2; 2,0 мг/л), БАП (1,0 мг/л), агаром «Fluka» (5 г/л). До внесения агара рН среды доводили 1 Н растворами КОН или HCl до значения 5,7.

Готовую среду разливали в манжеты (по 20-30 мл в каждую), стерилизовали автоклавированием при температуре 121⁰С течение 20 мин. Манжеты с мини побегов содержали в световой комнате при температуре 25±1⁰С с 16-ти часовым фотопериодом в течение 2-х недель до образования корней.

Образование первичных корней отмечали на 10-12 день после их пересадки на индуцирующую среду. Процент укоренения варьировал от 36,4 до 75% в зависимости от сорта.

Далее растения-регенеранты с 2-3 корнями извлекали из манжет и переносили в почвенную смесь или гидропонную установку для адаптации к условиям закрытого грунта.

Таблица 2 – Модифицированный состав питательной среды МСУ для этапа укоренения *in vitro*

Компоненты питательной среды, мг/л			
Соли макроэлементов		Соли микроэлементов	
NH ₄ NO ₃	825	H ₃ BO ₃	3,1
KNO ₃	950	MnSO ₄ · 4H ₂ O	11,15
CaCl ₂ · 2H ₂ O	220	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,0125
MgSO ₄ · 7H ₂ O	185	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,0125
KH ₂ PO ₄	85	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	4,3
Витамины		Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,125
Тиамин (B ₁)	0,1	KJ	0,415
Пиридоксин (B ₆)	0,5	Железо-хелатный комплекс	
Никотиновая к-та (PP)	0,5	FeSO ₄ · 7H ₂ O	13,9
		Na ₂ ЭДТА · 2H ₂ O	18,65
Сахароза	15	Фитогормоны	
Агар	5	ИМК	0,1-1,0
		ИУК	0,5
		2,4 Д	0,2- 2,0
		БАП	1,0

На основе проведенных исследований разработана схема поэтапного использования протоколов питательных сред для получения не укорененных и укорененных мини побегов роз из пазушных почек и апикальных меристем роз.

Разработанная схема успешно применена для микроклонального размножения сортов роз относящихся к разным садовым группам. Ниже, в качестве примеров, приведены протоколы использования питательных сред для получения укорененных и не укорененных микро черенков *in vitro* сортов роз различных садовых групп в культуре изолированных пазушных почек и апексов побегов.

Протоколы питательных сред для получения укорененных мини побегов из пазушных почек чайно-гибридной розы сорта Парео-4.

Введение в культуру *in vitro*: твердая питательная среда, содержащая соли макро- и микроэлементов, витамины по прописи МС дополненная глицином (2 мг/л), аскорбиновой кислотой (2 мг/л), мезо-инозитом (100 мг/л), сахарозой (20 г/л), БАП (1,5 мг/л), агаром «Fluka» (5 г/л), рН 5,7. Коэффициент размножения 1,3.

Собственно микроклональное размножение: пассирование на свежие питательные среды МС. Коэффициент размножения 3,6

Укоренение *in vitro*: твердая питательная среда, содержащая ½ солей макро- и микроэлементов, витамины по прописи МС дополненная глицином (2 мг/л), аскорбиновой кислотой (2 мг/л), мезо-инозитом (100 мг/л), сахарозой (15 г/л), комбинацией ИМК (1,0 мг/л) + ИУК (0,5 мг/л), 2,4-Д (0,2 мг/л в отдельности), агаром «Fluka» (5 г/л), рН 5,7. Укоренение – 100 %.

Протокол питательных сред для получения не укорененных мини побегов из апексов побегов (меристем) чайно-гибридной розы сорта Боника.

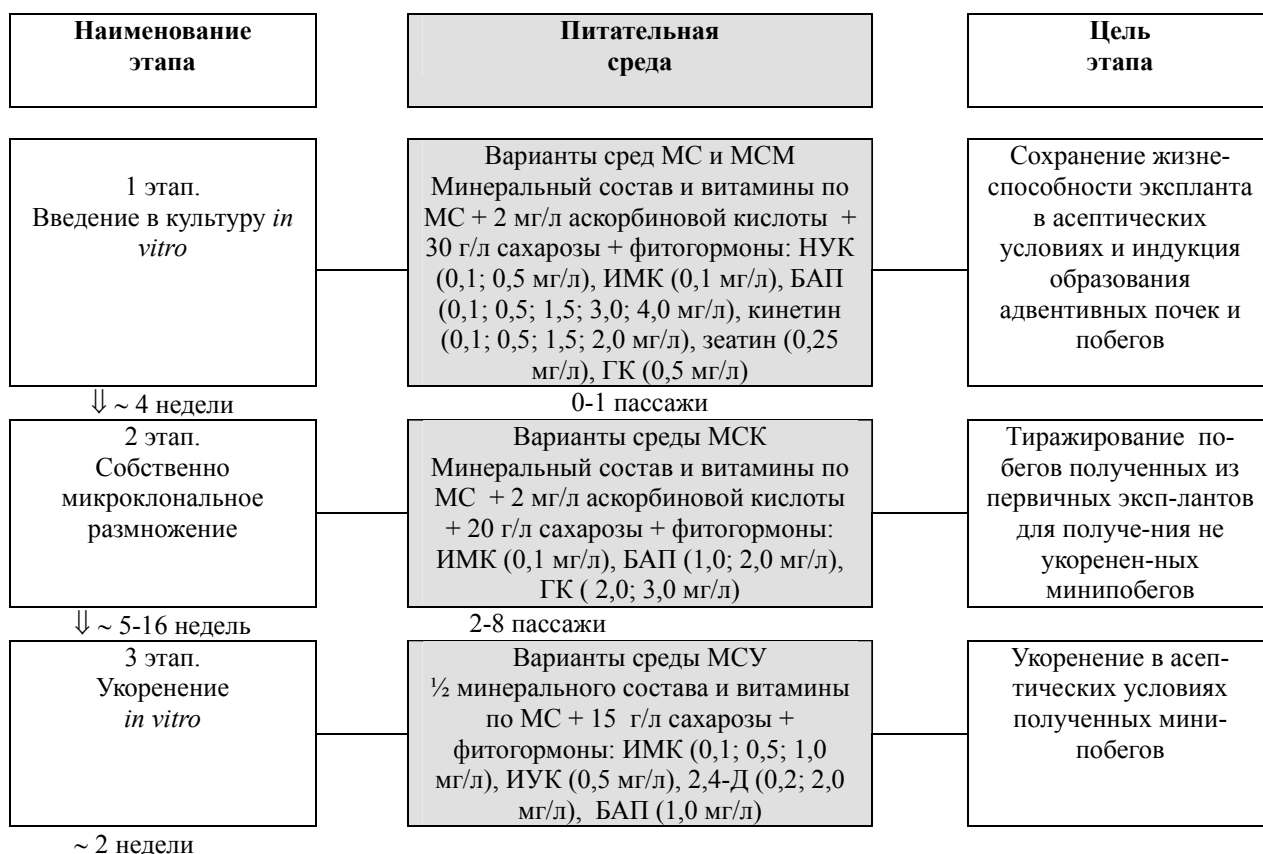


Рисунок - Схема поэтапного использования протоколов питательных сред для микроклонального размножения сортов роз разных садовых групп

Введение в культуру *in vitro*: твердая питательная среда МСМ, содержащие соли макро- и микроэлементов, витамины по прописи Мурасиге и Скуга, дополненная глицином (2 мг/л), аскорбиновой кислотой (2 мг/л), мезо-инозитом (100 мг/л), сахарозой (20 г/л), БАП (1,5 мг/л), зеатином (0,25 мг/л), агаром «Fluka» (5 г/л), pH 5,7. Выживаемость эксплантов – 100 %.

Литература

- 1 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.
- 2 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.
- 3 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.
- 4 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.
- 5 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», 12-13 мая, Алматы. – 2010. – С. 341-343.
- 6 Stone M. *Propagation of miniature roses by plant tissue culture.* – In O'Donnell M.A. eds. *Tested studies for laboratory teaching.* – 2006. – Vol. 27. – P. 239-263.
- 7 Khosravi P., Kermani M.J., Nematzadeh G.A., Bihanta M.R. *A protocol for mass production of Rosa hybrida cv. Iceberg through in vitro propagation // Iranian J. of Biotechnology.* - 2007. – Vol. 5, N 2. – P. 100-104.
- 8 Razavizadeh R., Ehsanpour A.A. *Optimization of in vitro propagation of Rosa Hybrida L. cultivar Black Red // American-Eurasian J. Agric. And Environ Sc.* – 2008. – Vol. 3, N1. – P.96-99.
- 9 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, N6. – P. 583-586.
- 10 Murashige T., Skoog F. *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum,* 1962, V. 15. – P. 473-497.

Summary

Reports of use nutrient media for microclonal propagation of roses concerning different garden groups are optimised.

Тұжырым

Раушан сорттарын клондық көбейтудің этаптарына арналған қоректік орталардың протоколдары өңделді.

ӘОЖ: 633.85:631.527:577.1