

## Floribundinių rožių dauginimas *in vitro*

### Modesta Kandzežauskaitė

Vytauto Didžiojo universitetas,  
Vileikos g. 8,  
LT-44404 Kaunas,  
el. paštas  
m.kandzezauskaite@gmf.vdu.lt

### Natalija Burbulis

Lietuvos žemės ūkio universitetas,  
Studentų g. 11,  
Akademijos mstl.,  
LT-53361 Kauno r.,  
el. paštas natalija@nora.lzua.lt

Floribundinių rožių tyrimai *in vitro* atlikti Lietuvos žemės ūkio universiteto Genetikos–biotechnologijos laboratorijoje. Siekiant išsiaiškinti floribundinių rožių mikrodauginimo galimybes iš papastinių pumpurų skirtingos sudėties MS (Murashige and Skoog) ir WPM (Woody Plant Medium) maitinamosiose terpėse, tirtos dvi floribundinių rožių veislės – *Barbecue* ir *Lilli Marlene*. Ūglių regeneracijai naudotos MS ir WPM maitinamosios terpės su augimo regulatoriais 3-indolilacto rūgštimi (IAR), 6-benzilaminopurinu (BAP) ir kinetinu. Ūglių ūknydinimui tirtos MS ir WPM maitinamosios terpės, papildytos 0,02 mg/l 2,4-D-dichlorfenoksiacto rūgšties, ir tos pačios sudėties maitinamosios terpės be augimo regulatoriaus. Tyrimo rezultatai parodė, kad per tris kultivavimo mėnesius MS terpėje iš vieno eksplanto gauta 11,94 (*Barbecue*) ir 14,93 (*Lilli Marlene*) mikroūglių. Daugiausiai ūknų (vidutiniškai 10,3 vnt.) suformavo *Lilli Marlene* rožės MS terpėje su augimo regulatoriumi 2,4-D. *Barbecue* ūgliai, ūknydinami WPM terpėje su 2,4-D, suformavo mažiausiai (2,8 vnt.) ūknų.

Nustatyta, kad rožių veislės *Barbecue* ir *Lilli Marlene* gana lengvai dauginasi *in vitro*, eksplantu naudojant papastinius pumpurus. *Lilli Marlene* mikroūglių ūknydinimui tinkamesnė MS terpė su 2,4-D. *Barbecue* mikroūglių rizogenezės procesas geriau vyksta WPM terpėje be augimo regulatoriaus.

**Raktapodžiai:** floribundinė rožė, mikrodauginimas, ūknydinimas, fitohormonai

### AVADAS

Lietuvoje dekoratyviausios ir želdynams tinkamiausios yra floribundinės rožės (*Rosa floribunda*) [2]. Šios rožės sunkokai dauginasi paprastais vegetatyviniais dauginimo būdais, dažnai pažeidžiamos švairių patogenų [14], todėl aktualu išauginti ligomis neapsikrėtusią, sparčiai dauginamą ištistus metus sodinamąją medžiagą. Norint gauti sveikas, su veislei būdingomis savybėmis, greitai dauginamas rožes, taikomi *in vitro* metodai [11]. G. P. Hill 1967 m. pradėjo laipiojanėjų rožių regeneracijos iš papastinių pumpurų tyrimus [6]. Tačiau pirmosios *in vitro* rožės gautos iš lapų [4, 8] ir tarpubamblio segmentų [17]. Daugumos autorių duomenys rodo, kad rožės *in vitro* sunkiai dauginasi iš papastinių pumpurų, regeneruoja tik kai kurios veislės [1, 5]. Naujais tyrimais rodo, kad hibridinės (*Rosa hybrida*) rožės regeneruoja iš papastinių pumpurų [15]. Tačiau duomenų apie floribundinių rožių mikrodauginimą iš papastinių pumpurų rasti nepavyko.

Rožių mikrodauginimo sėkmė priklauso nuo teisingo maitinamosios terpės parinkimo. Keičiant augimo regulatorių koncentraciją mitybinėje terpėje galima auginti ūglius tiesiai iš eksplanto. Kad ūgliai suformuotų ūknį, didesnių problemų nekyla, tam tikslui naudojamos atitinkamos fitohormonų koncen-

tracijos ir deriniai [17]. Daugelis autorių savo darbuose nurodo skirtingas mitybines terpes – SH (Shenk and Hildebrand) [7], originalias ir modifikuotas MS ir WPM [9, 19, 22]. Kartais pateikti duomenys labai skirtingi. Švairių grupių rožių dauginimui *in vitro* dažniausiai naudojami MS ir WPM maitinamosios terpės [12, 18], tačiau kokios terpės tinka floribundinių rožių mikrodauginimui iš papastinių pumpurų *in vitro*, rasti nepavyko. Todėl svarbu išsiaiškinti, kokios sudėties maitinamojoje terpėje regeneruoja bei ūknijasi šios rožės.

Šio darbo tikslas – iširti floribundinių rožių mikrodauginimo iš papastinių pumpurų skirtingos sudėties maitinamosiose terpėse galimybes.

### METODAI IR SĄLYGOS

Tyrimai atlikti 2001–2002 m. Lietuvos žemės ūkio universiteto Genetikos–biotechnologijos laboratorijoje. Tirtos *Barbecue* ir *Lilli Marlene* rožės, eksplantai – papastiniai pumpurai. Dauginimui buvo parenkami geriausi su šiediniais pumpurais ūgliai. Ūgliai buvo supjaustomi 3–4 cm ilgio segmentais su vienu papastiniu pumpuru. Eksplantai 7 minutes sterilinami 70% etanolio tirpale, po to 3 kartus perplaunami steriliu vandeniu. Sterilioje aplinkoje išpjauti iš stiebo papastiniai pumpurai buvo sodinami ant MS

[12] ir WPM [19] maitinamøjø terpjø, papildytø fitohormonais: 0,5 mg/l BAP (6 benzilaminopurinas); 0,5 mg/l IAR (indolil-3-acto rūgøtis) ir 0,5 mg/l kinetino. Naudojama agarizuota maitinamoji terpė, pH 4,9–5,2.

Ant maitinamosios terpės per pirmas 4–5 savaites roþės eksplantas tãsta. Jam uþaugus iki 1–2 cm, prasideda naujø ūgliø proliferacija. Tuo metu buvo atrenkami veislei bũdingi augalai, o formuojantys kaliø arba regenerantai su morfologiniais nukrypimais buvo sunaikinti. Ūgliui kas 4 savaites buvo persodinami á ðvieþiã, tokios paėios sudėties maitinamãjã terpã. Padauginti roþjø ūgliai buvo kultivuoti esant 16 h fotoperiodui ir  $24 \pm 2C^\circ$  (dienã) /  $20 \pm 2C^\circ$  (naktã) temperatũrai.

Buvo ðaknydinami 1–2 cm ilgio roþjø mikroūgliai. Ðaknydinimui *in vitro* buvo tirtos 4 variantø maitinamosios terpės: MS terpė be augimo reguliatoriø (MS-1); WPM terpė be augimo reguliatoriø (WPM-1); MS terpė su 0,02 mg/l 2,4-D (MS-2) ir WPM terpė su 0,02 mg/l 2,4-D. Visø keturiø maitinamøjø terpjø makrodruskø koncentracija sumaþinta iki 0,5 pradinės koncentracijos lygio. Po 4–5 savaiėjø ásiðaknijusios roþės buvo sodinamos á durpiø substratã (pH 6,4), á daigintuves. Prieð persodinimã buvo suskaiėiuotos susiformavusios ðaknys ir iðmatuotas jø ilgis.

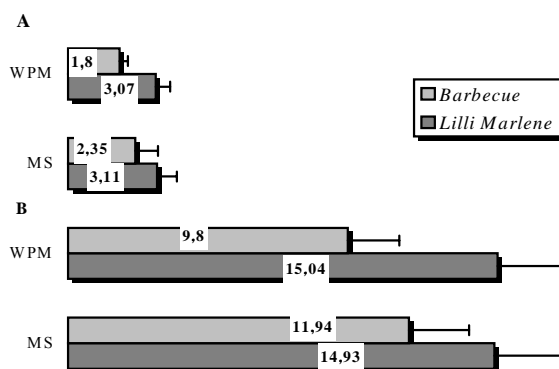
Tyrimø duomenys ávertinti dispersinės analizės metodu [16].

## REZULTATAI IR JØ APTARIMAS

Literatũros duomenimis, arbatinės roþės *in vitro* gautos per 8 savaites [13]. Ðiø tyrimø rezultatai parodė, kad floribundiniø roþjø augalai-regenerantai uþaugo per 8–9 savaites. Floribundines roþes ið papastiniø pumpurø *in vitro* pavyko padauginti dvifaziu dauginimo bũdu (ūgliø regeneracijos ir mikroūgliø ásiðaknijimo etapai).

**Ūgliø regeneracija.** Per pirmãsias 4–5 savaites roþjø eksplantai tãso tiek MS, tiek WPM maitinamosiose terpėse. Jiems uþaugus 1–2 cm, prasidėjo naujø ūgliø proliferacija. Per 1 mėnesã daugiausiai mikroūgliø vienam eksplantui suformavo *Lilli Marlene* roþės (1 pav.). Kultivuojant ðios veislės papastinius pumpurus tiek MS, tiek WPM terpėse, dauginimosi koeficientas buvo beveik vienodas ir sudarė atitinkamai 3,11 ir 3,07 vieneto. *Barbecue* eksplantai abiejø variantø terpėse suformavo maþesnã ūgliø kiekã, palyginti su *Lilli Marlene*. MS terpėje *Barbecue* dauginimosi koeficientas buvo 1,2 karto didesnis nei WPM terpėje.

Po trijø mėnesjø maþiausiai mikroūgliø suformavo *Barbecue* roþės, kultivuojamos WPM terpėje (9,8 vnt./eksplantui). Ðioje terpėje suformuotø mikroūgliø kiekis buvo 1,2 karto maþesnis nei MS



MS – Murashige ir Skoog terpė; WPM – Woody Plant terpė

1 pav. Mikroūgliø kiekis vienam eksplantui. A – po 1 mėnesio, B – po 3 mėnesjø

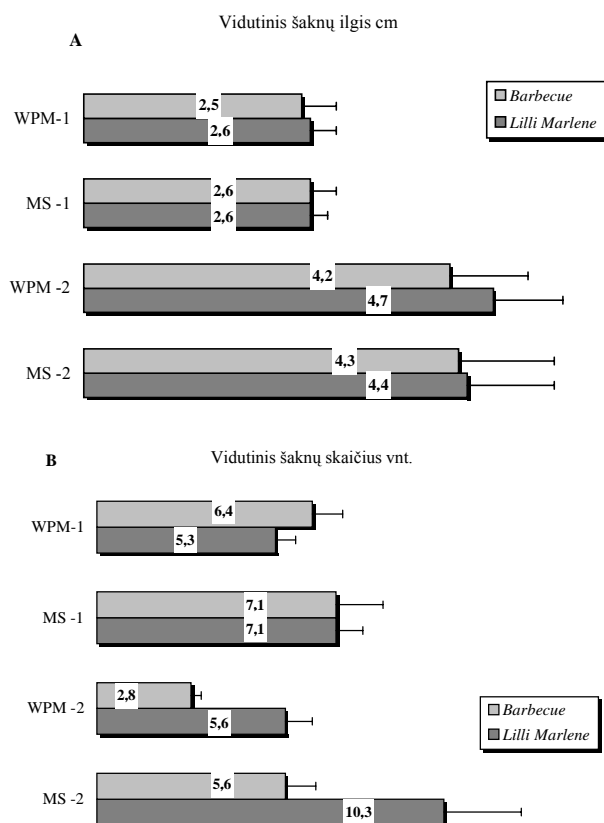
terpėje. *Lilli Marlene* roþės abiejø variantø terpėse suformavo beveik vienodã mikroūgliø kiekã – 15,04 vnt./eksplantui (WPM (Woody Plant Medium)) ir 14,93 vnt./eksplantui (MS).

Vertinant *Lilli Marlene* mikroūgliø susidarymã, esminio skirtumo tarp tirtø terpjø nenustatyta. MS ir WPM terpėse ðios veislės izoliuoti pumpurai suformavo praktiðkai vienodã mikroūgliø kiekã vienam eksplantui. Gauti rezultatai leidþia daryti prielaidã, kad *Lilli Marlene* roþėse mikroūgliø susidarymã ið papastiniø pumpurø labiau nulemia genotipo potencialinės galimybės, nei mitybinės terpės sudėtis. Genotipo atakã roþjø regeneracijai paþymi ir kiti mokslininkai [3, 5, 10].

Vertinant *Barbecue* veislės mikroūgliø susidarymã skirtingose terpėse nustatyta, kad MS terpėje susiformuoja daugiau ðios veislės mikroūgliø nei WPM terpėje. Tai rodo, kad ðios veislės morfogenezė *in vitro* priklauso ne tik nuo fitohormonø kiekio, bet ir nuo druskø koncentracijos terpėje.

**Ðaknydinimas.** Ðaknydinami 1–2 cm ilgio mikroūgliai su gerai iðsivysėiusiais lapais. Parenkant optimaliã maitinamãjã terpã ðaknydinimui, buvo tirtos modifikuotos MS ir WPM terpės su augimo reguliatoriais ir be jø. Vieni autoriai ðaknydinimui *in vitro* rekomenduoja naudoti mitybinã terpã be augimo reguliatoriø [20], o kiti pataria naudoti auksinus [21]. Mũsø atliktø tyrimø rezultatai rodo, kad ir viena, ir kita nuomonė yra teisinga – ðaknø skaiėiø bei jø ilgã sãlygoja konkretaus genomo jautrumas egzogeninio auksino poveikiui.

Analizuojant tyrimo rezultatus, nustatyta, kad MS ir WPM terpėse su augimo reguliatoriumi uþaugo ilgesnės roþjø ðaknys nei ðiose terpėse be augimo reguliatoriaus. Ilgiausias (4,7 cm) ðaknis suformavo *Lilli Marlene* roþės terpėje WPM-2 (2A pav.). WPM-1 terpėje vidutinis ðios veislės ūgliø ðaknø ilgis buvo 2,1 cm trumpesnis nei WPM-2 terpėje. Trumpiausias (2,5 cm)



2 pav. Ąsidaknijusio rožių vidutinis ōaknø ilgis (A) ir vidutinis ōaknø skaičius (B) skirtingø variantø terpëse: MS-1 – Murashige ir Skoog be fitohormonø; WPM-1 – Woody Plant Medium be fitohormonø; MS-2 – Murashige ir Skoog su 0,02 mg/l 2,4-D; WPM-2 – Woody Plant Medium su 0,02 mg/l 2,4-D

ōaknis ūpaugino *Barbecue* veislës rožës WPM-1 terpëje, kur vidutinis ōaknø ilgis buvo 1,7 cm trumpesnis nei WPM-2 terpëje. Naudojant ōaknydinimui tiek MS, tiek WPM terpes be auksinø, abiøjø tirtø veisliø mikroūgliai suformavo praktiškai vienodo (2,5–2,6 cm) ilgio ōaknis.

Vertinant vidutiná susidariusio ōaknø skaiëio skirtingose terpëse nustatyta, kad MS-1 terpëje abi veislës suformavo vienodá vidutiná skaiëio ōaknø – po 7,1 vieneto (2B pav.). Daugiausia ōaknø suformavo *Lilli Marlene* rožës MS terpëje su augimo regulatoriumi (vidutiniškai 10,3 vnt.). Ōios veislës MS terpëje be augimo regulatoriaus vidutinis ōaknø skaiëius buvo 3,2 vieneto mažesnis nei MS terpëje su augimo regulatoriumi. Mažiausiai (2,8 vnt.) ōaknø suformavo *Barbecue* ūgliai, ōaknydinami WPM terpëje su 2,4-D. *Lilli Marlene* ōios sudëties terpëje suformavo vidutiniškai dvigubai daugiau ōaknø nei *Barbecue* rožës. Panaðūs rezultatai gauti ir MS terpëje su augimo regulatoriumi, kur *Lilli Marlene* ūgliai ūpaugino vidutiniškai po 10,3, o *Barbecue* – po 5,6 ōaknø. WPM terpëje be augimo regulatoriaus *Barbecue* ūgliai suformavo vidutiniškai 2,3 karto dau-

giau ōaknø nei tos paëios sudëties terpëje su augimo regulatoriumi. Panaðūs rezultatai gauti ir MS terpëje, kur ōios veislës ūgliai terpëje be 2,4-D suformavo vidutiniškai 1,5 vnt. ōaknø daugiau nei terpëje su 2,4-D.

Šaknydinant *Lilli Marlene* mikroūglius WPM terpëje, augsino analogas 2,4-D besiformuojanëio ōaknø skaiëiui esminës átakos neturëjo. MS terpëje su 2,4-D kiekvienas ōios veislës mikroūglis suformavo vidutiniškai 3 ōaknimis daugiau, palyginti su variantu be fitohormonø.

Veislei *Barbecue* veikiausiai būdingas kiek kitoks hormonalinis organogenezës reguliavimo mechanizmas – atsakas á egzogeniná auksino poveiká. Literatūroje nurodoma [4], kad organogenezës procesas priklauso ir nuo antrinio fitohormonø tarpininkø, tarp jø ir Ca<sup>2+</sup>, kiekio. Gauti duomenys leidžia daryti prielaidá, kad esant didesniai Ca<sup>2+</sup> kiekiui (WPM terpëje) dėl egzogeninio auksino poveikio tam tikra dalis baltymø dėl pasikeitusios erdvinës struktūros tampa fermentø inhibitoriais. Todël beveik pusë genetiškai sąlygotø ōios veislës mikroūgliø inicialinio lãstelio praranda morfogenetiná kompetentingumá, sumapëja meristeminiø ūdinio ir besiformuojanëio ōaknø kiekis.

## IŠVADOS

Floribundinės rožës (*Barbecue* ir *Lilli Marlene*) regeneruoja mikroūglius iš papastinio pumpurø. Iš tirtø rožių veisliø *Lilli Marlene* pasiūymi didesniu nei *Barbecue* dauginimosi *in vitro* koeficientu.

*Lilli Marlene* rožių mikrodauginimui iš papastinio pumpurø tinka tiek MS (Murashige and Skoog), tiek WPM (Woody Plant Medium) modifikuotos mitybinës terpës, o *Barbecue* mikrodauginimui tinkamesnë MS mitybinë terpë.

Nustatyta terpës ir genotipo átaka floribundinių rožių mikroūgliø rizogenezëi *in vitro*. Mitybinë terpë mikroūgliams ōaknydinti *in vitro* turi būti parenkama kiekvienai veislei individualiai, atsiūvelgiant á genotipo jautrumá egzogeniniams fitohormonams. *Lilli Marlene* mikroūgliams ōaknydinti tinkamesnë modifikuota MS terpë su 0,02 mg/l 2,4-D. *Barbecue* mikroūgliø rizogenezës procesas geriau vyksta modifikuotoje WPM terpëje be augimo regulatoriaus.

Gauta  
2003 05 14

## Literatūra

1. Arif M. B., Khatamian H. *In vitro* morphogenesis from callus of *Rosa hybrida* // PGRSA Quarterly. 1996. Vol. 24. N 3. P. 104–110.
2. Boguðevičiūtė A., Ėirpus J., Juronis V. Rožës. Vilnius: Valstybinis leidybos centras, 1992. 108 p.

3. Bredmose N., Hansen J., Nielsen J. Topographic influences on rose bud and shoot growth and flower development are determined by endogenous axillary bud factors // *Acta Horticulturae*. 2001. Vol. 547. P. 177–184.
4. Burger D.W., Liu L., Zary D.W. Organogenesis and plant regeneration of *Rosa hybrida* L. // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1990. Vol. 21. P. 147–152.
5. Dubois L. M. L., de Vries D. P. The direct regeneration of adventitious buds on leaf explants of glasshouses-grown cut rose cultivars // *Acta Horticulturae*. 1996. Vol. 424. P. 327–329.
6. Hill G. P. Morphogenesis of shoot primordia in cultured stem tissue of a garden rose // *Nature*. 1967. Vol. 216. P. 596–597.
7. Kintzios S., Manos C., Makri O. Somatic embryogenesis from mature leaves of *Rosa* (*Rosa* sp.) // *Plant Cell Reports*. 1999. Vol. 18. N 6. P. 467–472.
8. Larson R. A. Introduction to floriculture (2nd edition). San Diego: Academic Press, 1992. P. 225–232.
9. Lauzer D., Laberge C. Establishment of a collection of *Rosa* species through *in vitro* embryo culture // *HortScience*. 1996. Vol. 31. N 3. P. 458–459.
10. Leffering L., Kok E. Regeneration via leaf segments of rose // *Prophyta*. 1990. Vol. 8. 244 p.
11. Löffler H. J., Florack D. E. A. Engineering for bacterial and fungal disease resistance // *Biotechnology of ornamental plants*. 1997. Vol. 16. P. 313–333.
12. Murachige T. and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant*. 1962. Vol. 15. P. 65–69.
13. Pati P. K., Sharma M., Ajuja P. S. Micropropagation, protoplast culture and its implications in the improvement of scented rose // *Acta Horticulturae*. 2001. Vol. 547. P. 147–158.
14. Puipa A. Ropės. Vilnius: Mokslas, 1977. 208 p.
15. Rout G. R., Debata B. K., Das P. Somatic embryogenesis in callus cultures of *Rosa hybrida* L. cv. Landora // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1991. Vol. 27. P. 65–69.
16. Sakalauskas V. Statistika su STATISTIKA. Vilnius: Mokslas, 1998. 348 p.
17. Van der Salm T. P. M., van der Toorn C. J. G., Hanisch ten Cate C. H. Somatic embryogenesis and shoot regeneration from excised adventitious roots of the rootstock *Rosa hybrida* L. 'Moneyway' // *Plant Cell Reports*. 1996. Vol. 15. P. 522–526.
18. Shenk R. U., Hildenbrandt A. C. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures // *Botanica*. 1972. Vol. 50. N 12. P. 199–204.
19. Stanys V. Sodo augalų mikrovegetatyvinio dauginimo metodiniai nurodymai. Baltai, 1998. 28 p.
20. Zaidi N., Khan N. H., Zafar F., Zafar S. I. Bulbous and cormous monocotyledonous ornamental plants *in vitro* // *Science Vision*. 2000. Vol. 6. N 1. P. 58–73.
21. De Wit J. C., Esendam H. F., Honkanen J. J. and Tuominen U. Somatic embryogenesis and regeneration of flowering plants in rose // *Plant Cell Reports*. 1990. Vol. 9. P. 456–458.
22. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. Москва: Наука, 1964. С. 348.

**Modesta Kandzejauskaitė, Natalija Burbulis**

### **IN VITRO PROPAGATION OF ROSA FLORIBUNDA**

#### **S u m m a r y**

Investigations were carried out in the Genetic-biotechnological Laboratory of Lithuanian Agricultural University. The aim of this research was to investigate the micropropagation *in vitro* of the rose varieties *Barbecue* and *Lilli Marlene*. For micropropagation *in vitro*, the base of axillary bud as explant of varieties *Barbecue* and *Lilli Marlene* were cultivated on MS (Murashige and Skoog) and WPM (Woody Plant Medium) media with IAR, BAP and kinetine. MS and WPM media with 0.02 mg/l 2,4-D and the same composition media without growth regulator were used for the *in vitro* rooting of microshoots. After three months 11.94 (*Barbecue*) and 14.93 (*Lilli Marlene*) plantlets were obtained from one explant on MS medium. *Lilli Marlene* roses on MS medium with a growth regulator formed mostly roots (10.3 units). *Barbecue* shoots formed least roots (2.8 units) on WPM medium with 2,4-D. The rooting of *Lilli Marlene* was best on MS medium with 2,4-D and *Barbecue* on WPM medium without growth regulator.

**Key words:** *Rosa floribunda*, micropropagation, rooting, phytohormones

**Модеста Кандзежаускайте, Наталия Бурбулис**

### **РАЗМНОЖЕНИЕ ФЛОРИБУНДНЫХ РОЗ IN VITRO**

#### **Р е з ю м е**

В Генетико-биотехнологической лаборатории Литовского сельскохозяйственного университета с целью выяснить микроразмножение флорибундных роз из пазушных почек в питательных средах MS (Murashige and Skoog) и WPM (Woody Plant Medium) разного состава исследованы два сорта флорибундных роз – *Barbecue* и *Lilli Marlene*. Для регенерации побегов употреблены питательные среды MS и WPM с регуляторами растения: β-индолил-3-уксусная кислота (ИУК), 6-бензиламинопуридин (БАП) и кинетин. Для укоренения побегов исследованы питательные среды, пополненные 0,02 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), и питательные среды такого же самого состава, только без регулятора растения. Результаты исследований показали, что за три месяца культивирования в MS среде из одного экспланта было получено 11,94 (*Barbecue*) и 14,93 (*Lilli Marlene*) микропобега. Больше всего корней (в среднем 10,3 шт.) сформировали розы *Lilli Marlene* в MS среде с регулятором растения 2,4-Д. Побеги *Barbecue*, которые укоренялись в среде WPM с 2,4-Д, сформировали меньше всего (2,8 шт.) корней.

Установлено, что сорта роз *Barbecue* и *Lilli Marlene* довольно легко размножаются *in vitro*, как эксплант употребляя пазушные почки. Для укоренения микропобегов *Lilli Marlene* больше подходит MS среда с 2,4-Д. Прочес ризогенезы микропобегов *Barbecue* лучше проходил в WPM среде без регулятора растения.

**Ключевые слова:** флорибундная роза, микроразмножение, укоренение, фитогормоны