



**ОСОБЕННОСТИ ДЕПОНИРОВАНИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА**

***ROSA L. В КУЛЬТУРЕ IN VITRO***

**FEATURES OF DEPOSITING REPRESENTATIVES OF THE GENUS ROSA**

**L. UNDER IN VITRO CONDITIONS**

**Соболева Екатерина Владиславовна**, младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии растений, Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН (127276, Россия, г. Москва, ул. Ботаническая, д. 4), тел. 89652713765, e-mail: 9030096237@mail.ru

**Soboleva Ekaterina Vladislavovna**, junior researcher, laboratory of plant biotechnology, Main Botanical Garden named after N.V. Tsitsina of the Russian Academy of Sciences (4 Botanicheskaya st., Moscow, 127276, Russia), tel. 8(965) 271-37-65, e-mail: 9030096237@mail.ru

**Аннотация**

Работа посвящена разработке метода длительного депонирования при пониженной температуре сортов роз с изменением концентрации углеводов и использованием ретарданта в составе питательной среды. Было оценено влияние длительного депонирования в условиях пониженной температуры на регенерационный потенциал и последующие укоренение микрорастений розы *in vitro*, а также приживаемость растений-регенерантов во время адаптации к условиям *ex vitro*. Наилучшие результаты по длительному хранению *in vitro* растений в состоянии замедленного роста были получены с

## Международный журнал прикладных наук и технологий "Integral"

использованием питательной среды  $\frac{1}{2}$  MS с добавлением 40 г/л сахарозы. Использование ретарданта «Тур» в концентрации до 15 мг/л оказало отрицательное действие на жизнеспособность для большинства сортов.

### **Abstract**

The aim of this study is to develop a method for long-term deposition at a low temperature of varieties of roses with a change in the concentration of carbohydrates and the use of growth retardants in the nutrient medium. We assessed the effect of conservation under low temperature conditions on the regeneration potential and subsequent rooting of rose plantlets *in vitro*, as well as the survival rate of regenerating plants during adaptation to *ex vitro* conditions. The best results for *in vitro* conservation of plants by slow growth storage were obtained using  $\frac{1}{2}$  MS culture medium supplemented with 40 g / l sucrose. The use of TUR retardant at a concentration up to 15 mg / l had a negative effect on the viability of most varieties.

**Ключевые слова:** *Rosa* L., депонирование *in vitro*, клональное микроразмножение.

**Key words:** *Rosa* L., deposition *in vitro*, clonal micropropagation.

### **Введение**

Роза (*Rosa* L.) – это род семейства розоцветных (Rosaceae), объединяющий различные виды дикорастущих (шиповники) и культурных (розы) растений.

Растения внешне очень различны, это прямостоячие или стелющиеся многостебельные кустарники, высотой от 0,3 до 2,5 м, а некоторые вечнозеленые плетистые виды достигают 10 м. Основой куста являются разные по возрасту и толщине побеги. В зависимости от вида, группы и сорта побеги различаются по длине: от 10-30 см (у групп миниатюрных и почвопокровных роз) до 2-4 м (плетистые крупноцветковые) [1].

Деревянистые стебли и побеги почти всегда покрыты шипами различной величины и формы. Листорасположение очередное, листья

## Международный журнал прикладных наук и технологий "Integral"

сложные – 5- и 13-листочковые, с прилистниками, непарноперистым рассечением. Листья могут быть как глянцевыми (блестящими), так и матовыми, морщинистыми или же гладкими. У подавляющего большинства сортов листья блестящие [1, 3].

Цветки энтомофильные и обоеполые, могут быть как пятилепестковые, так и густомахровые, по форме преимущественно чашевидные, по положению одиночные, в соцветиях щитковидно-метельчатого типа. Преобладающая окраска у околоцветника – розовая или белая, реже быть кремовая, малиновая или же желтая. Цветение, в основном, повторяется несколько раз в течении лета [2, 3].

Для некоторых членов подрода одновременно со свободным перекрестным опылением показаны нечетная перманентная полиплоидия, самоопыление и апомиксис. Непосредственные плоды (орешки) помещены в мясистый гипантий, представляющий собой ложный плод. Плоды созревают в августе-сентябре, содержат от 3-5 до 100 и более семян. Семена принадлежат к разряду труднопрорастающих, с глубоким комбинированным покоем, из-за слабой влагопроницаемости плодовой оболочки и присутствия ингибиторов, которые накапливаются в гипантии во время созревания.

В настоящее время мировой ассортимент насчитывает около 500 сортов и форм шиповника, кустарниковые розы (садовые и дикорастущие) имеют более 400 разновидностей, а сортов роз (выведенных в результате селекции) более 30 тысяч.

Ввиду своей декоративности и разнообразия розы активно применяются в озеленении. Розы выращивают в кустовой и штамбовой формах, используют в групповых, бордюрных и одиночных посадках, а также для создания живых изгородей [4]. В промышленном цветоводстве розам отведена роль главной выгоночной культуры. В настоящее время роза находит применение и в качестве эфиромасличной, лекарственной и даже пищевой культуры [5, 6].

## Международный журнал прикладных наук и технологий "Integral"

Одной из основных черт большинства сортов рода *Rosa L.* является их низкая способность к размножению вегетативным путём. Особенности вегетативного размножения сильно меняются в зависимости от сорта и предковых видов, что связано с особенностями их физиологии, биохимии и морфологии.

В нынешнее время наблюдается тенденция к переходу с привитой культуры роз на корнесобственную [7]. Причиной такому факту служит ряд трудностей при производстве привитых роз и некоторые отрицательные аспекты, которые отмечаются у привитых роз. Выращивание различных представителей рода *Rosa L. in vitro* даёт возможность получить большое количество генетически однородного, корнесобственного посадочного материала за короткий срок.

Огромное значение в технологии размножения *in vitro* имеет разработка метода длительного сохранения растений, который даёт возможность создать резервный банк редких, исчезающих, ценных, новых видов и сортов разных культур [8].

Хранение в условиях нормального роста происходит в стандартных условиях для микроразмножения, при этом методе поддержания ценных генотипов применяется своевременная пересадка на свежие питательные среды, обеспечивающая дальнейший рост микрорастений, что влечет за собой затраты и повышенную трудоемкость [9]. Частота генетических отклонений зависит от скорости клеточных делений, в связи с этим риск появления уклоняющихся форм может быть существенным на фоне постоянных пересадок микрорастений на свежую питательную среду. При постоянных пересадках растительного материала с одной питательной среды на другую может произойти множество негативных последствий: нарушение стерильности, возникновение соматической изменчивости, потеря морфогенетического и регенерационного потенциала растений и их гибель [10].

Депонирование растительного материала *in vitro* является более ресурсосберегающим способом поддержания коллекций микрорастений, по причине увеличения интервала субкультивирования регенерантов [11, 12].

В большинстве случаев, способность растений к генетически стабильной регенерации значительно выше в культурах с замедленным ростом, поэтому разработка новых и совершенствование существующих методов хранения растений в состоянии замедленного роста является перспективным направлением для сохранения генофонда [13]. Основной методический подход к депонированию растений *in vitro* - достижение замедленного метаболизма, поддерживающего максимальную жизнеспособность тканей экспланта [14].

Целью данной работы является разработка методики длительного депонирования представителей рода *Rosa* L. в культуре *in vitro*.

#### **Материалы и методы исследований**

В работе использовались введенные в культуру *in vitro* сорта *Rosa* (L.): «Acropolis», «Rise'n'shine», «Дюймовочка», «Rosarium Uetersen», «Jubile du Prince de Monaco», «Marie Baumann», которые ранее предоставлены из розария Отдела декоративных растений Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина Российской академии наук (ГБС РАН).

В виде источника информации при планировании методики исследования была использована коллективная монография Митрофановой И.В., 2018 год [8].

Депонирование опытных микрорастений в состоянии замедленного роста проводилось с использованием среды, содержащей  $\frac{1}{2}$  концентрации минеральной основы. В опыте по изучению влияния концентрации осмотика на жизнеспособность эксплантов в условиях депонирования использовали сахарозу в концентрациях 20, 40 и 60 г/л.

В качестве ретарданта был использован препарат «ТУР» в концентрациях 7,5 и 15 мг/л. Тур (хлорхолинхлорид, хлористый-2-хлорэтилтриметиламмоний, ССС) - регулятор роста, биологически активный

Международный журнал прикладных наук и технологий "Integral" химический препарат, препятствующий приросту в длину вегетативной массы побегов, механизм действия которого основан на сдерживании процессов роста клеток растяжением. Антипод фитогормона гиббереллина.

Депонирование микропобегов роз производилось в климатической камере при низкой положительной температуре около +4 °С на фоне пониженной освещенности и с фотопериодом 8/16 ч.

После депонирования экспланты пересаживали на питательную среду MS с содержанием 0,5 мг/л 6-ВАР. Проводили анализ регенерационного потенциала. Для проведения оценки корнеобразования после содержания в условиях длительного депонирования, экспланты пересаживали на питательную среду MS с содержанием ИУК 1,5 мг/л.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Изучение влияния концентрации углевода в питательной среде на высоту микрорастений роз в условиях депонирования.**

Широко применяется способ добавления в питательные среды для замедления роста микрорастений *in vitro* органических веществ, обладающих осмотической активностью, таких как углеводы.

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа (Таблица 1) позволили установить, что изменение концентрации углевода в питательной среде не оказывает влияния на высоту микропобегов в условиях депонирования, ( $F_A=2,19 < F_{05}=3,04$ ) ( $F_A=2,19 < F_{01}=4,71$ ) - нулевая гипотеза принимается. Таким образом концентрация углевода от 20 до 60 г/л является оптимальной для депонирования и не оказывает существенного влияния на рост и развитие эксплантов (Рисунок 1).

Таблица 1 - Результаты двухфакторного дисперсионного анализа данных высоты микропобегов в зависимости от генотипа и концентрации углевода в составе питательной среды

Источник вариации	SS	df	ms	$\sigma^2$	F	F <sub>05</sub>	F <sub>01</sub>
Общая	555,20	215		2,567			
Фактор А	11,30	2	5,65		2,19	3,04	4,71

Фактор В	2,92	2	1,46		0,57	3,04	4,71
Взаимодействие АВ	6,39	4	1,60		0,62	2,42	3,41
Случайная	534,59	207	2,58	2,583			

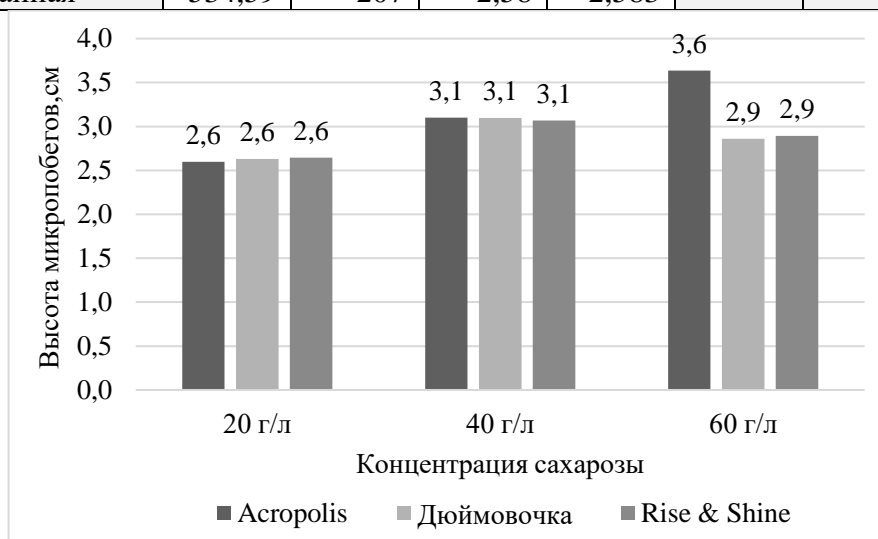


Рисунок 1 – Влияние концентрации сахарозы на высоту микропобегов при депонировании

Результаты анализа показали, что фактор генотипа не оказывает существенного влияния на рост микрорастений ( $F_B=0,57 < F_{05}=3,04$ ) ( $F_B=0,57 < F_{01}=4,71$ ). Возможной причиной этого может служить недостаточный объем первичных данных и исследуемых материалов.

Высота микропобегов достигала 3,1 см при депонировании на среде, содержащей 40 г/л сахарозы. Сравнительный анализ показал, что данная концентрация является оптимальной для длительного сохранения *in vitro* представителей *Rosa L.*

### **Изучение влияния концентрации ретарданта в питательной среде на жизнеспособность микрорастений роз в условиях длительного сохранения**

Применение ингибиторов роста в составе питательной среды является еще одним методом длительного сохранения в состоянии замедленного роста.

Опыт показал, что повышение концентрации ретарданта «ТУР» в составе питательной среды оказывало негативное воздействие на рост и развитие эксплантов (Рисунок 2). При концентрациях ретарданта 7,5 мг/л и

Международный журнал прикладных наук и технологий "Integral"

15 мг/л экспланты «Rosarium Uetersen» и «Jubile du Prince de Monaco» были повреждены частично или полностью, что лишало их дальнейшего регенерационного потенциала. Однако, среди изученных сортов, сорт «Marie Baumann» характеризовался большей жизнеспособностью. Даже при концентрации в 15 мг/л, экспланты сорта «Marie Baumann» частично сохраняли жизнеспособность.

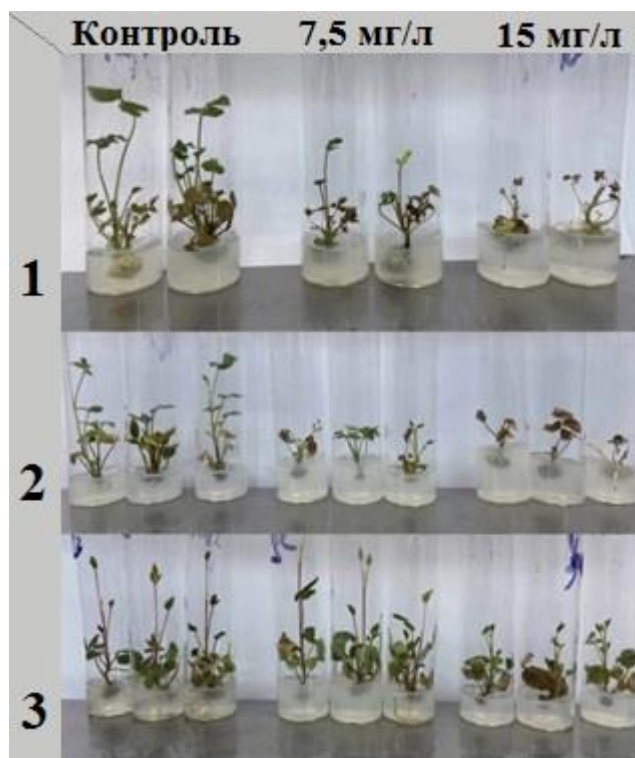


Рисунок 2 – Состояния эскплантов разных сортов роз при использовании ретарданта «ТУР» (1 – Сорт «Rosarium Uetersen», 2 – Сорт «Jubile du Prince de Monaco», 3 – Сорт «Marie Baumann»)

При использовании ретарданта «ТУР», независимо от концентрации, было выявлено образование каллуса на базальной части микрочеренков. При депонировании на среде с концентрацией ретарданта 15 мг/л в большинстве случаев наблюдали повышенный ризогенез. При этом микропобеги частично или полностью погибали.



**Изучение регенерационного потенциала микрорастений после длительного депонирования на питательной среде с различной концентрацией углеводов в условиях климатической камеры.**

После длительного депонирования при низкой положительной температуре на питательной среде с концентрацией углевода от 20 до 60 г/л сохранялся регенерационный потенциал. После пересадки микрорастений, хранившихся в условиях замедленного роста, на питательную среду для мультипликации не наблюдали их отличия от растений, культивируемых при стандартных условиях.

Длительное депонирование при пониженной температуре на питательной среде с различной концентрацией углеводов не оказало влияния на дальнейшее укоренение *in vitro* и приживаемость во время адаптации растений-регенерантов к условиям *ex vitro*.

**Заключение**

Разработан метод длительного сохранения микрорастений роз в состоянии замедленного роста при температуре +4 °С на фоне пониженной освещенности и фотопериодом 8/16 часов с использованием среды, содержащей ½ концентрации минеральной основы и 40 г/л сахарозы. Полученные данные согласуются с данными, полученными другими исследователями.

Применение препарата «Тур» в концентрации свыше 7,5 мг/л оказывало негативное влияние на жизнеспособность микрорастений.

Установлено, что длительное депонирование не оказывает отрицательного влияния на дальнейший регенерационный потенциал и укоренение микрорастений розы *in vitro*, а также адаптацию растений-регенерантов к условиям *ex vitro*.

**Литература**

1. Мовсеян, Л. И. Розы. Сад. Огород. Календарь / Л. И. Мовсеян. – Ростов-на-Дону: Изд-во Гранд, 2010. С. – 3-10.

2. Соломенцева, А. С. Внутривидовой полиморфизм шиповников в условиях засушливой зоны как фактор повышения биоразнообразия урбанизированных территорий / А. С. Соломенцева // Наука. Мысль. - 2016. - №7-1. – С. 25-30
3. Клименко, В. Н. Розы / В. Н. Клименко, З. К. Клименко. - Симферополь: Изд-во Таврия, 1974. – С. 5-20.
4. Клименко, З. К. Секреты выращивания роз / З. К. Клименко. - М.: Изд-во «Фитон+», 2009. – С.128.
5. Березовская, О.Л. Садовые розы на Дальнем Востоке России (морфологические признаки и возможности культивирования) / О.Л. Березовская. Автореф. дис. канд. биол. наук. Владивосток, 2008. – С. 35.
6. Магомедов, Г.О. Полуфабрикаты из шиповника и сроки годности жироемких изделий. Кондитерское производство / Г. О. Магомедов, Т. Н. Мирошникова, О. В. Абдулгалимова. – Воронеж, 2003. – № 4. – С. 26-27.
7. Баев, В.И. Новое в выращивании саженцев садовых роз / В. И. Баев, Б. Р. Джабаев. – Махачкала: Изд-во «Юпитер», 1998. – С. 246.
8. Митрофанова И.В. Основы создания генобанка *in vitro* видов, сортов и культур: Коллективная монография. – Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2018. – С. 171-249.
9. Romano, A. Conservacao *in vitro* de germenplasma de sobreiro (*Quercus suber* L.) / Romano, A. // J. Rev. Biol.-1994.- No 1-4.- P. 29-42.
10. Рыжкова, Н.С. Стабильность растений земляники садовой (*fragaria ananassa duch.*) после длительного хранения *in vitro* / Рыжкова, Н.С. / диссертация на соискание ученой степени кандидата сельскохозяйственных наук / Москва.-2005.-С. 9-15.
11. Blaich, R. Recherches sur les cultures de meristememes et d'organes de vinge *in vitro* en vue de la selection et de la conservation de genotypes / Blaich, R. // Bull O.I.V. – 1985. – Т.58. – No 650/651. - P. 391–395.

12. Машкина О.С. Методы культуры ткани в лесной генетике и селекции / Машкина, О.С., Табацкая, Т.М., Бурдаева, Л.М. // Лесхоз, информация. - 2002. – №6. -С.40.
13. Вечернина, Н. А. Сохранение биологического разнообразия редких, исчезающих видов, уникальных форми сортов растений методами биотехнологии : дис. д-ра биол. наук. Барнаул.-2006.-С. 325.
14. Самсонова, О. Н. Сохранение растений земляники садовой в стерильных условиях / Самсонова, О. Н., Трушечкин, В. Г. // Доклады ВАСХНИЛ, 1990. – № 10. - С. 31-34.

### References

1. Movsesyan, L. I. Roses. Garden. Garden. Calendar / L. I. Movsesyan. - Rostov-on-Don: Publishing house Grand, 2010.S. - 3-10.
2. Solomentseva, AS Intraspecific polymorphism of rose hips in the arid zone as a factor in increasing the biodiversity of urbanized areas / AS Solomentseva // Science. Thought. - 2016. -№7-1. - S. 25-30
3. Klimenko, V. N. Roses / V. N. Klimenko, Z. K. Klimenko. - Simferopol: Publishing house of Tavria, 1974. - S. 5-20.
4. Klimenko, ZK Secrets of growing roses / ZK Klimenko. - М .: Publishing house "Fiton +", 2009. - P.128.
5. Berezovskaya, O. L. Garden roses in the Russian Far East (morphological characteristics and cultivation possibilities) / O..L. Berezovskaya. Abstract of thesis. dis. Cand. biol. sciences. Vladivostok, 2008 .-- P. 35.
6. Magomedov, G.O. Rosehip semi-finished products and shelf life of fat-intensive products. Confectionery production / G.O. Magomedov, T.N. Miroshnikova, O.V. Abdulgalimova. - Voronezh, 2003. - No. 4. - S. 26-27.
7. Baev, V.I. New in the cultivation of garden rose seedlings / V. I. Baev, B. R. Dzhabaev. - Makhachkala: Jupiter Publishing House, 1998. - P. 246.
8. Mitrofanova I.V. Fundamentals of creating a genebank in vitro of species, varieties and cultures: Collective monograph. - Simferopol: IT "ARIAL", 2018. - pp. 171-249.

9. Romano, A. Conservacao in vitro de germeplasma de sobreiro (*Quercus suber* L.) / Romano, A. // J. Rev. Biol. 1994. No. 1-4. P. 29-42.
10. Ryzhkova, N.S. Stability of garden strawberry plants (*fragaria ananassa* Duch.) After long-term storage in vitro / Ryzhkova, N.S. / dissertation for the degree of candidate of agricultural sciences / Moscow.-2005.-p. 9-15.
11. Blaich, R. Recherches sur les cultures de meristememes et d'organes de vinge in vitro en vue de la selection et de la conservation de genotypes / Blaich, R. // Bull O.I.V. - 1985. - T.58. - No. 650/651. - P. 391–395.
12. Mashkina O.S. Methods of tissue culture in forest genetics and selection / Mashkina, O.S., Tabatskaya, T.M., Burdaeva, L.M. II Leskhoz, information. - 2002. - No6. -C.40.
13. Vechernina, NA Preservation of biological diversity of rare, endangered species, unique forms of plant varieties by methods of biotechnology: dis. Dr. Biol. sciences. Barnaul.-2006.-S. 325.
14. Samsonova, O. N. Preservation of garden strawberry plants in sterile conditions / Samsonova, O. N., Trushechkin, V. G. // Reports of VASKhNIL, 1990. - No. 10. - P. 31-34.

© *Соболева Е.В., 2021 Международный журнал прикладных наук и технологий "Integral" №4/2021*

**Для цитирования:** Соболева Е.В. ОСОБЕННОСТИ ДЕПониРОВАНИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *ROSA* L. В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*// Международный журнал прикладных наук и технологий "Integral" №4/2021