

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 633.81+57.085.23:575

Клональное микроразмножение розы эфиромасличной сорта «Фестивальная»: морфология, структура и плоидность микропобегов

И.В. Булавин*, Н.В. Корзина, Н.Н. Мирошниченко, Н.М. Саплев,
Д.К. Солдатов, О.М. Шевчук

«Никитский ботанический сад — Национальный научный центр РАН», Российская академия наук,
Россия, 298648, г. Ялта, Никита, Никитский спуск, д. 52

*e-mail: cellbiolnbs@yandex.ru

Род *Rosa* насчитывает более 200 видов и 18000 сортов, которые, помимо использования в цветоводстве, имеют экономическое значение благодаря наличию эфирного масла — источника натуральных ароматических компонентов. Продукция (эфирное масло, розовое масло, розовая вода и др.), полученная из розы эфиромасличной, используется в пищевой, парфюмерно-косметической и медицинской промышленности. Традиционное размножение растений проводят черенками, прививкой или окулировкой, которые являются сложными и трудоемкими процессами. Использование биотехнологических методов стало альтернативой вегетативному способу размножения розы. Большинство исследований направлены на подбор состава питательных сред и концентраций регуляторов роста, при этом вопросы структурной и генетической стабильности материала *in vitro* остаются дискуссионными. Целью данной работы было определение оптимальных условий культивирования *in vitro*, а также структуры, плоидности и относительного содержания ДНК микропобегов розы эфиромасличной сорта «Фестивальная». Показано, что для размножения материала эффективным был вариант питательной среды Мурасиге и Скуга, содержащий 1,0 мг/л 6-бензиламинопурина и 1,0 мг/л кинетина. Структурный анализ микропобегов после культивирования в течение 12 мес. выявил качественные и количественные изменения, обусловленные специфическими условиями *in vitro* и омоложением материала. Плоидность ядер в клетках листьев *in vitro* не отличалась от таковой побегов *ex situ*, как и относительное содержание ДНК (2,21 пг и 2,24 пг соответственно), что свидетельствует об определенной стабильности материала *in vitro*.

Ключевые слова: роза, межвидовой гибрид, *in vitro*, лист, световая микроскопия, проточная цитометрия

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-3-8

Введение

Род *Rosa* насчитывает более 200 видов и 18000 сортов [1, 2]. Помимо использования в отрасли цветоводства, растения имеют экономическое значение благодаря наличию эфирного масла — источника натуральных ароматических компонентов. Эфирное масло розы — одно из самых дорогих, имеет сложный компонентный состав и содержит гераниол, нерол, цитронеллол, фарнезол, линалоол, лимонен, 1-п-ментен, мирцен и пинен в различных соотношениях. Большую ценность представляют также биологически активные вещества, в том числе дубильные, органические кислоты, бета-каротин, цианин, смолы и воск [3]. Розовое масло, розовая вода и другая

продукция из розы эфиромасличной применяются в пищевой, парфюмерно-косметической и медицинской промышленности [4, 5]. Известны четыре основных вида, используемых в производстве эфирного масла — *Rosa damascena* Mill., *Rosa gallica* L., *Rosa moschata* Herrm. и *Rosa centifolia* L. [1].

Сорт розы «Фестивальная» выведен в 1959 г. методом межвидовой гибридизации путем скрещивания *Rosa damascena* Mill. × *Rosa gallica* L. (Казанлыкской розовой с Крымской красной), авторы — Р.И. Невструева, Т.В. Фролов, А.Ф. Новомлинченко. Растения характеризуются высокой массовой долей эфирного масла (от 0,12 до 0,14 % от сырой массы), урожайностью (в зависимости от района выращивания от 15,8 до 39,0 ц/га), сбором

масла (2,1–3,3 кг/га), малотребовательны к условиям среды и агротехнике, способны к быстрой адаптации в меняющихся условиях, могут использоваться в регионах с полусухим климатом [6]. Традиционное размножение розы проводят черенкованием, прививкой или окулировкой. Это сложные и трудоемкие процессы, поэтому использование биотехнологических методов в последние десятилетия является альтернативой вегетативному способу размножения [7–10].

На сегодня для данного сорта исследованы биологические особенности роста и развития, сроки прохождения фаз, морфология вегетативных и генеративных органов [6], анатомическое строение лепестков и локализация эфирного масла [11], особенности развития, строения мужских и женских генеративных структур [12]. В биотехнологическом аспекте для розы эфиромасличной «Фестивальная» отработаны способы введения в культуру *in vitro*, произведено размножение на питательной среде Мурасиге и Скуга (МС) с добавлением регуляторов роста растений: кинетина (Кин), 6-бензиламинопурина (6-БАП), 3-индолилуксусной кислоты (ИУК), гибберелловой кислоты (ГК₃) [4, 8, 13]; осуществлено укоренение побегов [14]; проанализировано влияние люминесцентного белого и красного света на морфогенез стеблевых эксплантов [15]. Также исследованы морфометрические параметры клеток тканей листа, его фотосинтетическая активность, определяемая методом индукции флуоресценции хлорофилла [4]. Проведен анализ структурных показателей органов микропобегов *in vitro* в сравнении с таковыми при длительном сохранении в условиях генобанка (36 мес.) [16]. Вместе с тем, отмечается недостаточная изученность факторов, лимитирующих клональное микроразмножение, и значительная зависимость процессов морфогенеза *in vitro* от генотипа [8]. Вопросы структурной организации [17], в том числе стабильности материала *in vitro* в целом [18–20], являются дискуссионными и для розы эфиромасличной остаются малоисследованными [16, 21, 22]. В связи с этим целью данной работы было определение оптимальных условий культивирования *in vitro*, анализ структуры, плоидности и относительного содержания ДНК микропобегов розы эфиромасличной сорта «Фестивальная».

Материалы и методы

В качестве объекта исследования выбрана роза эфиромасличная (*Rosa damascena* Mill. × *Rosa gallica* L.) сорта «Фестивальная», культивируемая *ex situ* на коллекционных участках Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН» (ФГБУН «НБС-ННЦ»), расположенных на высоте 200 м над уровнем моря,

в условиях субтропического климата средиземноморского типа.

Растительный материал для введения в культуру *in vitro* промывали под проточной водой с моющим средством и ополаскивали 3 раза дистиллированной водой. Сегменты побегов с вегетативными почками последовательно погружали в 70%-ный раствор этилового спирта (1 мин), 1%-ный раствор Тимеросала (20 мин) и 0,3%-ный раствор препарата ДезТаб (активный хлор 48–53%) с добавлением 3 капель детергента Твин-20 (15 мин). После каждого стерилизующего вещества сегменты трижды промывали стерильной дистиллированной водой.

В условиях ламинарного бокса SC2 (ESCO, Сингапур) от почек отделяли кроющие чешуи и материал (0,7–1,0 см) помещали на поверхность питательной среды МС [23], дополненной 1,0 мг/л 6-БАП, 0,25 мг/л ГК₃, 0,15 мг/л α-нафтилуксусной кислоты (НУК). На этапе микроразмножения побеги розы длиной 1,0 см субкультивировали на питательной среде МС, содержащей, в зависимости от варианта опыта, 0,5, 1,0 или 1,5 мг/л 6-БАП; 0,5, 1,0 или 1,5 мг/л Кин; 0,5 мг/л ГК₃ и 1,0 6-БАП на фоне неизменного присутствия 0,15 мг/л НУК. Контролем служила среда МС без регуляторов роста. Субкультивирование проводили каждые 30 сут. Общий срок культивирования составил 12 мес. Материал содержали в фитокапсулах «БИОТРОНа» при температуре 23 ± 1°C, 16-часовом фотопериоде и интенсивности освещения 37,5 мкМ м⁻²·с⁻¹ под лампами дневного света L36W/765 Cool Daylight (OSRAM, Россия).

Морфологию листьев растений *ex situ* и микропобегов *in vitro* исследовали при помощи стереомикроскопа SMZ745T (Nikon, Япония), оснащенного цифровой камерой DC29111251 (View Solutions, Китай) и программным обеспечением (ПО) ImageView v. x64, 3.7.10121.20171030. Цвет органов растений определяли согласно шкале А.С. Бондарцева [24].

Анатомический анализ проводили в апреле-мае 2023 г. на фиксированном материале. Для этого от 10 растений *ex situ* и микропобегов *in vitro* отделяли парные листочки сложного листа, фрагменты стеблей и сразу переносили в пенициллиновые флаконы с раствором формалина (38%), ледяной уксусной кислоты, спирта этилового (96%) и воды (1:0,5:5:3,5). Дополнительно добавляли несколько капель детергента Твин-20. Обезвоживание материала осуществляли в спиртах восходящей концентрации. В качестве промежуточной жидкости использовали толуол (Вектон, Россия). Материал заключали в парафиновую гомогенизированную среду Гистопoint Экстра (МедТехника-Поинт, Россия). Срезы толщиной 8–10 мкм изготавливали на полуавтоматическом ротационном микротоме Ротмик 2А (ОрионМедик, Россия), наклеивали на предметные стекла, предварительно обработанные раствором белка куриного яйца,

смешанным с глицерином в соотношении 1:1. Стекла со срезами сушили при помощи нагревательного столика Микростат-30/80 (Техном, Россия). Депарафинирование осуществляли толуолом в стеклянных емкостях Шиффердекера (2 ч). После предметные стекла со срезами переносили в 96%-ный спирт (1,5 ч), дистиллированную воду (10 мин), окрашивали водным раствором метиленовой сини (0,05%) (30 мин). Для заключения использовали раствор сахарозы (60%).

Полученные препараты исследовали с помощью микроскопа CX-41 (Olympus, Япония), оснащенного цифровой камерой SC 50 (Olympus, Германия) и ПО CellSens Imaging Software v. 1.17. Подсчет количественных анатомических показателей выполняли на цифровых изображениях с использованием ПО UTHSCSA ImageTool v. 3.00. Для образцов *ex situ* и *in vitro* анализировали по 30 клеток.

Исследование уровня ploидности и относительного содержания ДНК проводили на свежем материале. Части листочков сложного листа (около 0,5 см²) от 10 побегов *ex situ* и микропобегов *in vitro* помещали в WPB-буфер [25] с модификациями в виде увеличения содержания поливинилпирролидона (K10) до 2%, дополненный пропилий йодидом (50 мкг/мл), РНКазой (50 мкг/мл) и β-меркаптоэтанолом (0,3%), измельчали при помощи лезвия безопасной бритвы. Полученные образцы пропускали через фильтр CellTrics® (Partec, Германия) с диаметром пор 30 мкм. Анализ материала проводили с применением CyFlow® Ploidy Analyzer (Sysmex, Partec, Германия). В качестве внешнего контроля использовали растения *Ficus benjamina* L. [26]. Измерения проводили на одинаковых настройках анализатора с количеством ядер 5000–10000.

Статистический анализ выполняли с использованием ПО Past v. 4.03 [27]. Выборки проверяли на нормальность распределения и, в зависимости от полученного результата, использовали либо *t*-критерий, либо U-тест при $p \leq 0,05$. Табличные данные представлены в виде среднего значения (M) и стандартной ошибки среднего значения ($\pm m$).

Результаты и обсуждение

Основные этапы клонального микроразмножения — это стерилизация исходных эксплантов с введением их в условия *in vitro*, размножение, укоренение и адаптация полученных растений к нестерильным условиям. Для этого необходимо подобрать действенный и безопасный антисептик, физические факторы культивирования, состав питательной среды, тип и концентрации регуляторов роста, соответствующие конкретному этапу и поставленной задаче, учитывая особенности генотипа используемого материала [10, 28, 29].

При отработке приемов стерилизации способ с последовательным применением 70%-ного рас-

твора этилового спирта, 1%-ного раствора Тиме-росала и 0,3%-ного раствора препарата ДезТаб позволил получить 80,5% стерильных эксплантов розы эфиромасличной сорта «Фестивальная», которые помещали на питательную среду МС, содержащую 1,0 мг/л 6-БАП, 0,25 мг/л ГК₃, 0,15 мг/л НУК. Развертывание листьев наблюдали через 3 сут после введения в культуру *in vitro*, при этом первый пассаж характеризовался низким коэффициентом размножения (1,2%).

Побеги с 2–6 листьями, развившиеся из эксплантов через 30 сут после введения в стерильные условия, переносили на питательную среду для индукции множественного побегообразования, дополненную регуляторами роста. Известно, что на успешную реализацию морфогенетического потенциала влияет баланс цитокининов и ауксинов в составе питательной среды. Превалирование цитокининов в этом соотношении способствует повышению коэффициента размножения микропобегов [30–34]. В ряде публикаций указывается, что применение 6-БАП в качестве основного регулятора роста для эксплантов розы садовой и розы эфиромасличной на этапе размножения является наиболее эффективным по сравнению с Кин [13, 28, 32, 35, 36]. Также имеются данные, что введение в питательную среду ГК₃ оказывает положительное влияние на адвентивное побегообразование [8, 13, 37–39]. В наших исследованиях морфогенетический потенциал розы эфиромасличной «Фестивальная» изучали на среде МС, содержащей 6-БАП, Кин и ГК₃. Способность к органогенезу определяли по количеству микропобегов, развившихся в течение 30 сут на одном экспланте.

Как показали результаты, побегообразование с различной интенсивностью происходило во всех вариантах опыта. На питательной среде без регуляторов роста микропобеги были малочисленными ($1,1 \pm 0,18$ шт.), отмечены единичные случаи спонтанного ризогенеза. Варианты среды МС с 0,5 мг/л Кин или 0,5 мг/л 6-БАП незначительно стимулировали побегообразование — $1,2 \pm 0,51$ и $1,9 \pm 0,44$ шт. соответственно. Увеличение содержания 6-БАП в среде до 1,0 мг/л позволило получить $3,7 \pm 0,17$ микропобегов с небольшими листьями, которые желтели в нижней части стебля к завершению срока культивирования. Повышение концентрации Кин до 1,0 мг/л не способствовало увеличению побегообразования ($1,2 \pm 0,13$ шт.), при этом микропобеги удлинялись, увеличивались размеры листьев, что позволяет в дальнейшем применять среду с Кин для элонгации материала. При введении 1,0 мг/л 6-БАП и 1,0 мг/л Кин количество побегов ($3,9 \pm 0,26$ шт.) и листьев ($3,68 \pm 0,21$ шт.) превышало результаты контрольного варианта. Зеленый цвет листьев сохранялся на протяжении срока культивирования. В варианте опыта с 1,0 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л ГК₃ в те-

чение одного субкультивирования развилось $3,9 \pm 0,25$ шт. дополнительных микропобегов. Необходимо отметить, что у 30% эксплантов наблюдали разрастание и потемнение базальной части побега, в отдельных случаях формировались глобулы каллуса белого цвета. При введении в среду 1,5 мг/л 6-БАП количество микропобегов увеличивалось и достигало $4,1 \pm 0,34$ шт., возрастало и число листьев, при этом происходило уменьшение размеров листочков сложного листа, рахиса, дополнительных микропобегов, из которых формировались шарообразные конгломераты. Важно отметить, что развитие дополнительных микропобегов проходило в более длительные сроки и составило 45–55 сут (по сравнению с 30 сут культивирования на среде с 1,0 мг/л 6-БАП). Вариант среды МС с 1,5 мг/л Кин не был эффективным, активное побегообразование не отмечалось, крупные листья желтели.

Таким образом, оптимальными для индукции побегообразования у сорта «Фестивальная» оказались два варианта среды МС, содержащие: а) 1,0 мг/л 6-БАП + 0,5 мг/л ГК₃ (что согласуется с данными, полученными для эксплантов эфиромасличной розы «Радуга» и «Мичуринка» [8]) и б) 1,0 мг/л 6-БАП + 1,0 мг/л Кин.

Изучение анатомического строения растений *in vitro* проводят по нескольким направлениям: 1) выявление аномалий, 2) оптимизация условий культивирования, 3) оценка возможностей адаптационного характера к условиям *ex vitro* [20]. Нами проведен морфолого-анатомический анализ листьев и стеблей растений *ex situ* и микропобегов *in vitro*.

Для растений *ex situ* розы эфиромасличной «Фестивальная» характерен сложный непарноперистый лист, состоящий из рахиса, 5–7 листочков и двух прилистников, сросшихся с основанием черешка и свободных в верхней части (рис. 1А). Верхний непарный и боковые парные листочки зеленого (Е5 по шкале А.С. Бондарцева) или желто-зеленого цвета (И2), с малиновым оттенком (Д6) на абаксиальной поверхности. Форма непарного листочка эллиптическая или продолговато-яйцевидная, боковых парных – эллиптическая или обратно-яйцевидная. Верхушка непарного листочка заостренная, основание сердцевидное, выемчатое или округлое, край пильчатый или пильчато-городчатый (ближе к верхушке). Морфология парных листочков подобна непарным, при этом верхушка может быть округлой, а основание широко-клиновидным. Жилкование перисто-сетчатое. Кроющие

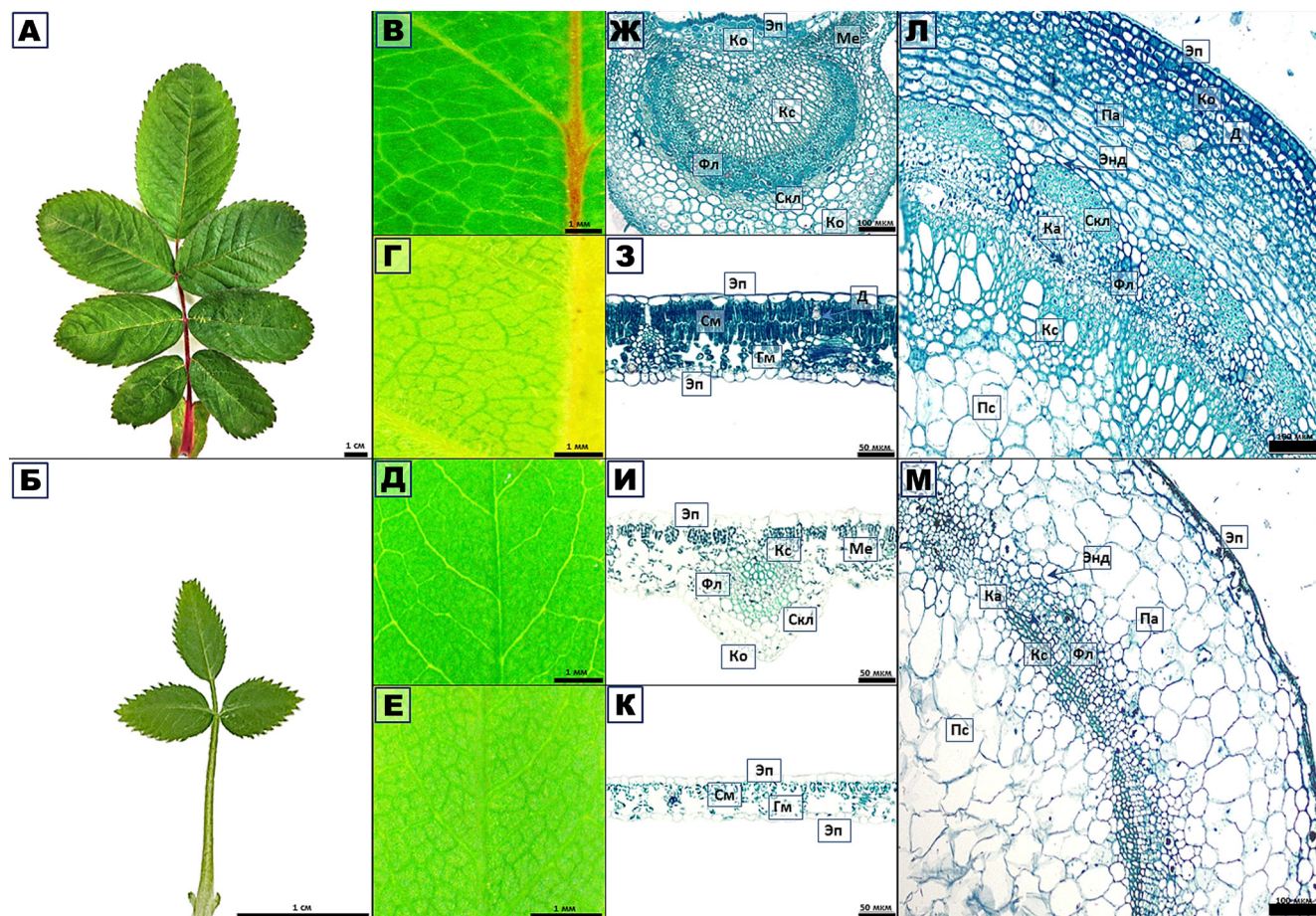


Рис. 1. Морфология (А–Е) и анатомия листочков (Ж–К), стеблей (Л–М) розы эфиромасличной сорта «Фестивальная» *ex situ* (А, В, Г, Ж, З, Л) и *in vitro* (Б, Д, Е, И, К, М). Гм – губчатый мезофилл, Д – друза, Ка – камбий, Ко – колленхима, Кс – ксилема, Ме – мезофилл, Па – паренхима, Пс – паренхима сердцевины, Скл – склеренхима, См – столбчатый мезофилл, Фл – флоэма, Энд – эндодерма, Эп – эпидерма (световая микроскопия).

трихомы (редкие) обнаруживали с двух сторон в области центральной и боковых жилок, с наибольшим их количеством на абаксиальной поверхности (рис. 1В, Г). Устьица локализовались на нижней стороне листочков, по периферии на концах зубчиков наблюдали гидатоды.

Рахис на адаксиальной стороне по цвету был малиновым (Д6), с абаксиальной — желто-зеленым (Б3). На всей поверхности обнаруживали головчатые трихомы, редкие шипы.

Проведен анализ структуры листочков первой верхней пары сложного листа. В области центральной жилки (рис. 1Ж) выделяли эпидерму, покрывающую кутикулой, колленхиму, закрытый коллатеральный пучок, окруженный склеренхимой на разной стадии дифференциации, которая с нижней части подстилалась паренхимой с утолщенными клеточными стенками и колленхимой, за которыми следовала покровная ткань. В боковой части листочка на поперечном срезе (рис. 1З) обнаруживали: верхнюю эпидерму, составленную из клеток овально-прямоугольной формы, покрытых кутикулой с внешней стороны; дифференцированный мезофилл, представленный двумя слоями клеток палисады, довольно плотно примыкающих друг к другу; 3–4 слоя губчатого мезофилла, составленного округлыми и овальными клетками; нижнюю однорядную эпидерму, состоящую из округлых/овальных клеток, высота и ширина которых была меньше таковых клеток верхней эпидермы в 1,2 и 1,4 раза соответственно. В области центральной и боковых жилок в клетках наблюдали включения в виде друз.

Исследовано строение однолетних неодревесневевших стеблей (рис. 1Л). Снаружи осевые органы были покрыты эпидермой, состоящей из мелких прямоугольных клеток, на внешних тангентальных клеточных стенках которых выявляли кутикулу. Колленхима, располагалась под покровной тканью неравномерно и формировала от 3 до 6–7 слоев. Ассимиляционная паренхима состояла из овальных или округлых клеток в виде 6–10 слоев, в которых были заметны включения в виде друз. Эндодерма была достаточно заметна. Далее располагался центральный цилиндр, в котором наблюдали склеренхиму перициклического происхождения (могла отсутствовать), первичную и вторичную флоэму, камбий, вторичную и первичную ксилему. Сердцевина состояла из паренхимных клеток округлой или овальной формы. Наличие отдельных пучков явилось свидетельством незавершенности перехода к непучковому типу строения.

У микропобегов *in vitro* розы эфиромасличной «Фестивальная» (1,5–2,5 см высотой) на рахисе (длиной 0,5–1,2 см) формировалось три листочка (один непарный и два парных), в базальной — находились прилистники, сросшиеся с черешком (рис. 1Б). Верхний непарный и боковые парные листочки были зеленого (Е5) или желто-зеленого

цвета (И2), с малиновым оттенком (Д6) на абаксиальной поверхности. Листочки по форме яйцевидные или эллиптические с заостренной верхушкой, округлым или выемчатым (непарные листочки) основанием, пильчатым краем. Тип жилкования перисто-сетчатый. Кроющие трихомы отсутствовали (рис. 1Д, Е), устьица локализовались на абаксиальной стороне, по периферии листочков на концах зубчиков обнаруживали гидатоды, на абаксиальной стороне вдоль центральной и боковых жилок находились редко расположенные головчатые трихомы.

Общий план анатомического строения листочков и стебля микропобегов розы эфиромасличной «Фестивальная» в условиях *in vitro* сохранялся сравнительно со структурой побегов *ex situ* (рис. 1И, К, М). Среди качественных анатомических изменений в листочках можно отметить уменьшение кутикулярного слоя и количества механических тканей (колленхимы под эпидермой и склеренхимы в нижней части проводящего пучка). Снижение степени развития механических тканей также было характерным и для стебля. Исследование количественных показателей тканей и клеток листочков на поперечных срезах выявило уменьшение высоты в области центральной жилки и боковой части органов, высоты и ширины проводящего пучка, клеток верхней эпидермы, столбчатого и губчатого мезофилла, высоты слоев мезофилла, количества проводящих элементов (ксилемы) (таблица). В литературе также имеются сведения об изменениях структуры органов растений/микропобегов *in vitro* под влиянием специфических условий культивирования [17, 20, 21]. Следует отметить, что существенные перестройки в анатомии отмечаются только при введении неоптимальных концентраций регуляторов роста в состав питательной среды, что находит свое подтверждение в работах других исследователей [20]. Большое количество регуляторов роста является причиной морфологических девиаций органов вследствие изменения их клеточной и тканевой организации. Полученные нами данные демонстрируют вариации некоторых морфологических и анатомических характеристик, связанных с омоложением растений вследствие культивирования *in vitro*.

В литературе отмечено, что омоложение *in vitro* может сопровождаться перестройками генома. Проточная цитометрия — метод, используемый для оценки изменений ploидности и содержания ДНК, в том числе у растений, получаемых биотехнологическим способом. Он достаточно быстрый, точный и позволяет исследовать большое количество клеток/ядер за меньшее время [40], и, согласно имеющимся сведениям, также используется для установления генетических изменений между материалом *in vitro* и материнскими растениями, как в комплексе с молекулярными маркерами [40–42], так и в отдельности [43, 44].

Таблица
Количественные анатомические показатели листочков розы
эфиромасличной сорта «Фестивальная» *ex situ* и *in vitro*

Параметр	<i>Ex situ</i>	<i>In vitro</i>
Высота листочка в области центральной жилки	423,36 ± 20,39	189,99 ± 9,19*
Высота проводящего пучка	152,68 ± 13,82	51,88 ± 3,82*
Ширина проводящего пучка	276,82 ± 15,13	97,85 ± 6,72*
Количество элементов ксилемы	57,6 ± 3,47	22,40 ± 2,50*
Высота листочка в боковой части	132,11 ± 4,28	89,29 ± 3,83*
Высота клеток верхней эпидермы	18,83 ± 0,70	14,69 ± 0,39*
Ширина клеток верхней эпидермы	28,16 ± 1,01	21,67 ± 1,41*
Высота клеток нижней эпидермы	15,30 ± 0,55	11,89 ± 0,47*
Ширина клеток нижней эпидермы	19,93 ± 1,04	17,71 ± 0,89
Количество слоев столбчатого мезофилла	2,00 ± 0,00	1,60 ± 0,16*
Высота клеток столбчатого мезофилла	33,16 ± 0,63	20,42 ± 0,69*
Ширина клеток столбчатого мезофилла	6,99 ± 0,14	7,80 ± 0,26*
Высота слоев столбчатого мезофилла	61,59 ± 3,23	28,87 ± 2,52*
Количество слоев губчатого мезофилла	3,40 ± 0,16	2,60 ± 0,16*
Высота клеток губчатого мезофилла	10,35 ± 0,28	11,88 ± 0,61*
Ширина клеток губчатого мезофилла	11,85 ± 0,34	13,12 ± 0,71
Высота слоев губчатого мезофилла	43,10 ± 2,62	41,48 ± 3,98

Примечание: * – статистически значимое различие между материалом *ex situ* и *in vitro*, при $p \leq 0,05$.

По данным литературы *R. damascena* [45, 46] и *R. gallica* [45–47] являются тетраплоидами. Содержание ДНК у *R. damascena* составляет 2,16, 2,26 пг [45, 46], *R. gallica* – 2,20 пг [46, 47]. Нами проведен анализ ploидности ядер и относительного содержания ДНК в клетках листьев *in vitro* в сравнении с таковыми *ex situ* розы эфиромасличной «Фести-

вальная» (*R. damascena* × *R. gallica*). Согласно полученным результатам, уровень ploидности растений не различался (рис. 2). Относительное содержание ДНК в ядрах клеток листьев побегов *ex situ* и микропобегов *in vitro* составило $2,21 \pm 0,04$ и $2,24 \pm 0,02$ пг соответственно, что свидетельствует об определенной стабильности материала *in vitro*. Подобные результаты были получены и для других культур. Так, сохранение ploидности и содержания ДНК в культуре *in vitro* показано для дыни при прямом органогенезе, при этом отмечено, что использование культуры ткани способствует изменению уровня ploидности [42]. Анализ содержания ДНК растений *Tylophora indica* (Burm.f.) Merrill., полученных *in vitro* путем прямого и непрямого органогенеза, а также через соматический эмбриогенез, не выявил существенных различий по искомому показателю в сравнении с таковым материнских растений [41]. В то же время, при исследовании *Cattleya tigrina* A. Rich. *in vitro* выявлены регенеранты (26,5%) с уровнем ploидности, увеличенным в два раза. Отмечено возможное влияние эндоредупликаций, происходящих непосредственно в интактных тканях орхидных [43]. В наших исследованиях показано отсутствие изменений, что является свидетельством стабильности *in vitro* непосредственно исследованного нами генотипа и оптимальности разработанного протокола.

Закключение

На основании биометрических показателей эксплантов розы эфиромасличной сорта «Фестивальная» установлено, что наиболее эффективным для размножения микропобегов в культуре *in vitro* является вариант питательной среды МС, содержащий 1,0 мг/л 6-БАП и 1,0 мг/л Кин. Исследование анатомии листочков сложного листа и микростеблей *in vitro* показало отсутствие существенных структурных перестроек, при этом выявлены качественные и количественные изменения, связанные

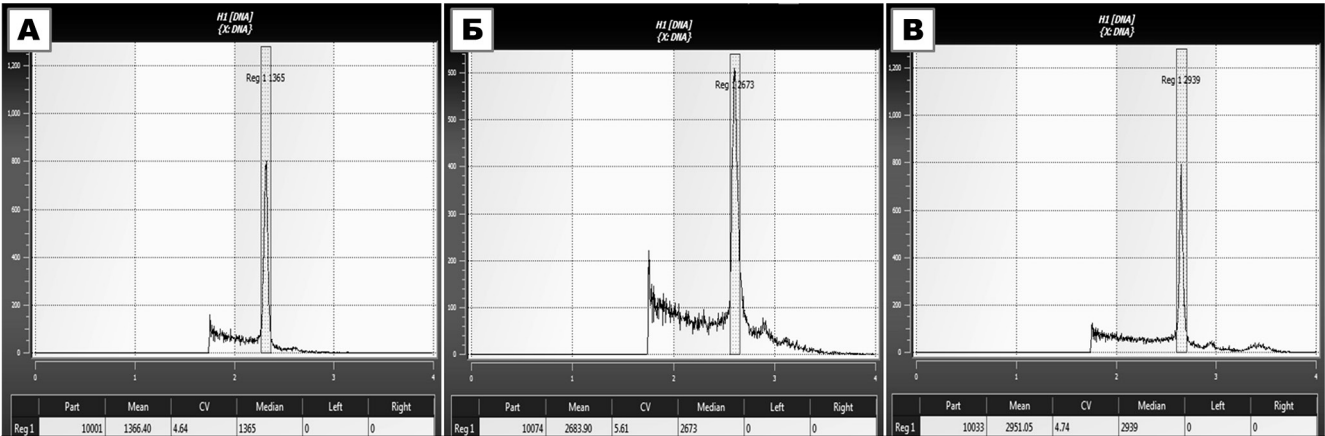


Рис. 2. Гистограммы ploидности исследуемого материала. А – образец ядер, выделенных из листовой пластинки *Ficus benjamina* (внешний контроль), Б – образец ядер, выделенных из клеток листочков розы эфиромасличной сорта «Фестивальная» *ex situ*, В – образец ядер, выделенных из клеток листочков розы эфиромасличной «Фестивальная» *in vitro*.

с условиями культивирования и омоложением материала. Анализ пloidности и относительного содержания ДНК методом проточной цитометрии не выявил существенных сдвигов, что свидетельствует о стабильности исследуемого показателя у розы эфиромасличной «Фестивальная» после 12 мес. культивирования *in vitro*. Полученные данные являются подтверждением действенности разработанного протокола для получения идентичных клонов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baydar H., Baydar N.G. The effects of harvest date, fermentation duration and Tween 20 treatment on essential oil content and composition of industrial oil rose (*Rosa damascena* Mill.). *Ind. Crop. Prod.* 2005;21(2):251–255.
2. Venkatesha K.T., Gupta A., Rai A.N., Jambhulkar S.J., Bisht R., Padalia R.C. Recent developments, challenges, and opportunities in genetic improvement of essential oil-bearing rose (*Rosa damascena*): A review. *Ind. Crop. Prod.* 2022;184(15):114984.
3. Zolotilov V., Nevkrytaya N., Zolotilova O., Seitadzhieva S., Myagkikh E., Pashtetskiy V., Karpukhin M. The essential-oil-bearing rose collection variability study in terms of biochemical parameters. *Agron.* 2022;12(2):529.
4. Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Браилко В.А., Лесникова-Седошенко Н.П. Биотехнологические и физиологические особенности культивирования *in vitro* ценных генотипов розы эфиромасличной. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология.* 2015;2(13):37–48.
5. Katekar V.P., Rao A.B., Sardeshpande V.R. Review of the rose essential oil extraction by hydrodistillation: An investigation for the optimum operating condition for maximum yield. *Sustain. Chem. Pharm.* 2022;29:100783.
6. Марко Н.В. Биоморфобиологические особенности розы эфиромасличной сорта Фестивальная при выращивании на ЮБК и в степном Крыму. *Таврический вестник аграрной науки.* 2020;4(24):98–113.
7. Pati P.K., Kaur N., Sharma M., Ahuja P.S. *In vitro* propagation of rose. *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants. Methods in molecular biology, vol 589.* Eds. S. Jain and S. Ochatt. N.Y., Dordrecht, Heidelberg, L.: Springer, Humana Press; 2010:163–176.
8. Егорова Н.А., Ставцева И.В. Микроразмножение сортов эфиромасличной розы в культуре *in vitro*. *Вестник Удмуртского университета. Серия «Биология. Науки о Земле».* 2016;2:45–52.
9. Молканова О.И., Васильева О.Г., Коновалова Л.Н. Научные основы сохранения и воспроизводства генофонда ценных и редких видов растений в культуре *in vitro*. *Бюлл. Гл. бот. сада.* 2005;2(201):78–82.
10. Kyte L., Kleyn J., Scoggins H., Bridgen M. *Plants from test tubes: An introduction of micropropagation* – 4th ed. Portland: Timber Press; 2013. 274 pp.
11. Семенова Е.Ф., Меженная Н.А., Преснякова Е.В. Анатомо-морфологические особенности лепестков как эфиромасличных структур цветков представителей рода *Rosa*. *ИВУЗ ПР Естественные науки.* 2014;3(7):5–17.
12. Шевченко С.В., Кузьмина Т.Н. Некоторые особенности эмбриологии представителей видов *Rosa spinosissima* L., *R. canina* L. и сортов *R. × damascena* Mill. в норме и при вирусной инфекции. *Сельскохозяйственная биология.* 2018;53(3):624–633.
13. Егорова Н.А., Ставцева И.В., Митрофанова И.В. Влияние сорта и факторов культивирования на клональное микроразмножение розы эфиромасличной. *Бюллетень ГНБС.* 2016;120:36–43.
14. Егорова Н.А., Ставцева И.В., Митрофанова И.В. Влияние сорта и состава питательной среды на укоренение розы эфиромасличной при микроразмножении *in vitro*. *Биомика.* 2018;10(1):11–15.
15. Корзина Н.В., Митрофанова И.В. Интенсивность освещения и морфогенез розы эфиромасличной в культуре *in vitro*. *Бюллетень ГНБС.* 2022;145:157–163.
16. Mitrofanova I.V., Brailko V.A., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Ivanova N.N., Mitrofanova O.V. Structure of vegetative organs in essential oil rose under standard culture conditions and long-term conservation *in vitro*. *Acta Hortic.* 2021;1315:185–190.
17. Manokari M., Priyadharshini S., Shekhawat M. Micro-structural stability of micropropagated plants of *Vitex negundo* L. *Microsc. Microanal.* 2021;27(3):626–634.
18. Kritskaya T.A., Kashin A.S., Kasatkin M.Y. Micropropagation and somaclonal variation of *Tulipa suaveolens* (Liliaceae) *in vitro*. *Russ. J. Dev. Biol.* 2019;50(4):209–215.
19. Bulavin I.V., Ivanova N.N., Mitrofanova I.V. *In vitro* regeneration of *Hyssopus officinalis* L. and plant genetic similarity. *Dokl. Biol. Sci.* 2021;499(1):109–112.
20. Plugatar Y.V., Bulavin I.V., Ivanova N.N., Miroshnichenko N.N., Saplev N.M., Shevchuk O.M., Feskov, S.A., Naumenko, T.S. Study of the component composition of essential oil, morphology, anatomy and ploidy level of *Hyssopus officinalis* f. *cyaneus* Alef. *Horticulturae.* 2023;9(4):480.
21. Mitrofanova I., Tsyupka V., Jain S.M. Morpho-anatomical characterization of *in vitro* regenerated plants. *Advances in plant tissue culture. Current Developments and Future Trends.* Eds. A.C. Rai, A. Kumar, A. Modi, and M. Singh. Cambridge: Academic Press; 2022:175–204.
22. Zakaria H.M., Dessoky E.S., Ismail I.A., Attia A.O., El-Hallous E.I. Analysis of genetic stability of the *in vitro* propagated *Rosa damascena* (Taif rose) plant. *Int. J. Adv. Res.* 2017;5(4):117–122.
23. Murashige T.A., Skoog F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 1962;15(3):473–497.
24. Novikov A., Sokolov S., Drapalyuk M., Zelikov V., Ivetic V. Performance of scots pine seedlings from seeds graded by colour. *Forests.* 2019;10(12):1064.
25. Loureiro J., Rodriguez E., Doležel J., Santos C. Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: A test with 37 species. *Ann. Bot.* 2007;100(4):875–888.

26. Skaptsov M.V., Smirnov S.V., Kutsev M.G., Shmakov A.I. Problems of standartization in flow cytometry of plants. *Turczaninowia*. 2016;19(3):120–122.
27. Hammer Ø.H., David A.T., Paul D.R. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron*. 2001;4(1):4.
28. Pati P.K., Rath S.P., Sharma M., Sood A., Ahuja P.S. *In vitro* propagation of rose – a review. *Biotechnol. Adv*. 2006;24(1):94–114.
29. Baig M.M.Q., Hafiz I.A., Hussain A., Ahmad T., Abbasi N.A. An efficient protocol for *in vitro* propagation of *Rosa gruss an teplitz* and *Rosa centifolia*. *Afr. J. Biotechnol*. 2011;10(22):4564–4573.
30. Carelli B.P., Echeverrigaray S. An improved system for the *in vitro* propagation of rose cultivars. *Sci Hortic*. 2002;92(1):69–74.
31. Roy P.K., Manum A.N.K., Ahmed G. *In vitro* plantlets regeneration of rose. *Plant Tissue Cult*. 2004;14(2):149–154.
32. Jabbarzadeh Z., Khosh-Khui M. Factors effecting tissue culture of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.). *Sci. Hort*. 2005;105(4):475–482.
33. Razavizadeh R., Ehsanpour A.A. Optimization of *in vitro* propagation of *Rosa hybrida* cultivar Black Red. *Am. Eurasian J. Agric. Environ. Sci*. 2008;3(1):96–99.
34. 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;1:41–53.
35. Nikbakht A., Kafi M., Mirmasoumi M., Babalar M. Micropropagation of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) cvs Azaran and Ghamsar. *Int. J. Agric. Biol*. 2005;7(4):535–538.
36. Podwyszyńska M., Orlikowska T., Trojak-Goluch A., Wojtania A. Application and improvement of *in vitro* culture systems for commercial production of ornamental, fruit, and industrial plants in Poland. *Acta Soc. Bot. Pol*. 2022;91(1):914.
37. Noodezh H.M., Moieni A., Baghizadeh A. *In vitro* propagation of the Damask rose (*Rosa damascena* Mill.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 2012;48(6):530–538.
38. Rout G.R., Debata B.K., Das P. *In vitro* clonal multiplication of roses. *Proc. Natl. Acad. Sci. India*. 1990;60:311–318.
39. Vijaya N., Satyanarayana G., Prakash J., Pierik R.L.M. Effect of culture media and growth regulators on *in vitro* propagation of rose. *Curr. Plant Sci. Biotechnol. Agric*. 1991;12:209–214.
40. Mangain J., Mujib A., Ejaz B., Gulzar B., Malik M.Q., Syeed R. Flow cytometry and start codon targeted (SCoT) genetic fidelity assessment of regenerated plantlets in *Tylophora indica* (Burm. f.) Merrill. *Plant Cell Tiss. Organ Cult*. 2022;150(1):129–140.
41. Abdolinejad R., Shekafandeh A., Jowkar A., Gharaghani A., Alemzadeh A. Indirect regeneration of *Ficus carica* by the TCL technique and genetic fidelity evaluation of the regenerated plants using flow cytometry and ISSR. *Plant Cell Tiss. Organ Cult*. 2020;143:131–144.
42. Raji M.-R., Farajpour M. Genetic fidelity of regenerated plants via shoot regeneration of muskmelon by inter simple sequence repeat and flow cytometry. *J. Saudi Soc. Agric. Sci*. 2021;20(2):88–89.
43. Fritsche Y., Deola F., da Silva D.A., Holderbaum D.F., Guerra M.P. *Cattleya tigrina* (Orchidaceae) *in vitro* regeneration: main factors for optimal protocorm-like body induction and multiplication, plantlet regeneration, and cytogenetic stability. *S. Afr. J. Bot*. 2022;149:96–108.
44. Catalano C., Carra A., Carimi F., Motisi A., Saje-va M., Butler A., Lucretti S., Giorgi D., Farina A., Abbate L. Somatic embryogenesis and flow cytometric assessment of nuclear genetic stability for *Sansevieria* spp.: an approach for *in vitro* regeneration of ornamental plants. *Horticulturae*. 2023;9(2):138.
45. Yokoya K., Roberts A.V., Mottley J., Lewis R., Brandham P.E. Nuclear DNA amounts in roses. *Ann. Bot*. 2000;85(4):557–561.
46. Doğan E., Kazaz S., Kiliç T., Dursun H., Ünsal T.H., Uran M. A research on determination of the performance *Rosa damascena* Mill. as pollen source in rose breeding by hybridization. *Uluslararası Tarla Bitkileri Kong-resi Özel Sayısı*. 2020;14:194–201.
47. Harmon D.D., Chen H., Byrne D., Liu W., Ranney T.G. Cytogenetics, ploidy, and genome sizes of rose (*Rosa* spp.) cultivars and breeding lines. *Ornam. Plant Res*. 2023;3:10.

Поступила в редакцию 30.05.2024

После доработки 08.10.2024

Принята в печать 11.11.2024

RESEARCH ARTICLE

Clonal micropropagation of the essential oil rose cultivar “Festivalnaya”: morphology, anatomy and microshoots’ ploidy level

I.V. Bulavin^{*} , N.V. Korzina , N.N. Miroshnichenko , N.M. Saplev ,
D.K. Soldatov , O.M. Shevchuk 

Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center, Russian Academy of Sciences,
Nikitskiy spusk 52, Nikita, Yalta, 298648, Russia

^{*}e-mail: cellbiolnbs@yandex.ru

The genus *Rosa* includes more than 200 species and 18,000 cultivars, which, in addition to being used in floriculture, are of economic importance due to the presence of essential oil, a source of natural aromatic components. Products (essential oil, rose oil, rose water, etc.) obtained from essential-bearing oil rose are used in the food, perfume, cosmetic and medical industries. Traditional rose propagation is carried out by cuttings, grafting or budding, which are complex

and time-consuming processes. Biotechnological methods have become an alternative to the vegetative method of rose propagation. The main studies are aimed at selecting the mineral composition of nutrient media and concentrations of growth regulators, while the issues of structural and genetic stability of the material *in vitro* are still discussed. Therefore, the work aimed to determine the optimal conditions for *in vitro* cultivation, structure, ploidy, and relative DNA content of essential oil rose microshoots. Essential oil rose cultivar “Festivalnaya” (*Rosa damascena* Mill × *Rosa gallica* L.) was used as the material. Buds were sterilized and transferred on the Murashige-Skoog modified medium supplemented with 1.5 mg/l 6-benzylaminopurine (6-BAP), 0.25 mg/l gibberellic acid (GA₃), 0.15 mg/l α-naphthylacetic acid. Micropropagation of the obtained microshoots was carried out on the Murashige-Skoog culture medium containing 1.0 mg/l 6-BAP; 1.0 mg/l kinetin (Kin); 1.0 mg/l 6-BAP + 1.0 mg/l Kin; 1.0 mg/l 6-BAP + 0.5 mg/l GA₃. The structure analysis was carried out according to the generally accepted methods. Ploidy and relative DNA content were determined by flow cytometry. Induction of direct organogenesis *in vitro* from vegetative buds of essential oil rose was carried out. At the stage of micropropagation, the maximum number of adventitious microshoots was obtained on Murashige-Skoog medium with the introduction of 1.0 mg/l 6-BAP and 1.0 mg/l Kin. Structural analysis of microshoots after subculturing for 12 months revealed qualitative and quantitative changes due to specific *in vitro* conditions and material rejuvenation. The ploidy level of the leaf blade nuclei *in vitro* did not differ from those of *ex situ* shoots. The relative content of DNA in the leaf nuclei of shoots *ex situ* and microshoots *in vitro* was 2.21 pg and 2.24 pg, respectively, which indicates a certain stability of the material *in vitro*.

Keywords: *Rosa*, interspecific hybrid, *in vitro*, leaf, light microscopy, flow cytometry

Funding: This study was performed under the state assignment of the FSFIS «NBG-NSC» FNNS-2024-0004 (structural analysis and ploidy level investigation of the plant material) and FNNS-2022-0002 (*in vitro* cultivation), and on the base of the Unique scientific facilities «PHYTOBIOGEN».

Сведения об авторах

Булавин Илья Владимирович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр., зав. лабораторией клеточной биологии и анатомии Никитского ботанического сада — Национального научного центра РАН. Тел.: 8-3654-25-05-30; e-mail: cellbiolnbs@yandex.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9929-0946>

Корзина Наталья Васильевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр., зав. лабораторией морфогенеза и депонирования растений *in vitro* Никитского ботанического сада — Национального научного центра РАН. Тел.: 8-3654-25-05-30; e-mail: natali.korz@yandex.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-5220-5700>

Мирошниченко Наталья Николаевна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории клеточной биологии и анатомии Никитского ботанического сада — Национального научного центра РАН. Тел.: 8-3654-25-05-30; e-mail: natali_nbs88@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0009-0005-3650-4010>

Саплев Никита Максимович — науч. сотр. лаборатории клеточной биологии и анатомии Никитского ботанического сада — Национального научного центра РАН. Тел.: 8-3654-25-05-30; e-mail: saplev.upk@ya.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1575-6639>

Солдатов Денис Константинович — инженер-исследователь лаборатории клеточной биологии и анатомии Никитского ботанического сада — Национального научного центра РАН. Тел.: 8-3654-25-05-30; e-mail: den.alone.ru@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0009-0004-9856-5444>

Шевчук Оксана Михайловна — докт. биол. наук, гл. науч. сотр., зам. директора по науке, зав. отделом технических культур и биологически активных веществ Никитского ботанического сада — Национального научного центра РАН. Тел.: 8-3654-25-00-98; e-mail: oksana_shevchuk1970@mail.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3811-3161>