СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОЛОГИЯ, 2022, том 57, № 3, с. 579-590

Клональное микроразмножение

УДК 635.9:581.143.6:58.084(571.1) doi: 10.15389/agrobiology.2022.3.579rus

АДАПТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ПОДВОЯ *Rosa canina* L., ПОЛУЧЕННОГО in vitro, В УСЛОВИЯХ ЮГА ЗАПАДНОЙ СИБИРИ*

О.Ю. ВАСИЛЬЕВА✉, Е.В. АМБРОС, М.В. КОЗЛОВА

Размножение садовых роз проводится посредством прививки сортов на устойчивые подвои, преимущественно внутривидовые формы *Rosa canina* L. Подземная часть этих подвоев зимостойка даже в условиях лесостепи и южной тайги Западной Сибири, однако их системы побегов формирования (СПФ), на которых образуются генеративные побеги, повреждаются в период зимовок. В Центральном сибирском ботаническом саду СО РАН (ЦСБС, г. Новосибирск) проводятся многолетние исследования сезонного развития, онтогенеза, биоморфологии, репродуктивной биологии и зимостойкости видов шиповников из секции *Caninae* Crép. В настоящей работе впервые приведены результаты многолетнего изучения зимостойкости и семенной продуктивности микроклонально размноженной высокозимостойкой отборной формы *R. canina*, дана оценка состояния СПФ после экстремальных зимовок. Выявлено, что после экстремальных зимовок растения отборной формы не переходят в категорию «временно не цветущих». Целью работы было введение в культуру in vitro и размножение посредством прямого органогенеза перспективной зимостойкой формы *Rosa canina*, используемой в качестве подвоя для садовых роз, а также оценка адаптивного потенциала у растений, полученных посредством клонального микроразмножения, в условиях континентального климата. Эксперименты in vitro проводили на отборной зимостойкой форме, выделенной в ЦСБС из растений F_3 местной репродукции. Первичными эксплантами служили меристемы с двумя листовыми примордиями, изолированные из пазушных почек однолетних вегетативных побегов. На этапе введения в культуру in vitro экспланты культивировали в течение 3 сут на жидкой питательной среде по прописи Мурасиге-Скуга (МС), дополненной глутатионом (100,0 мг/л) и глюкозой (30,0 г/л). Для индукции прямого органогенеза использовали среду МС с 2,0 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП) и 1,0 мг/л 3-индолилуксусной кислотой (ИУК). Собственно микроразмножение регенерантов проводили на среде МС с 1,0 мг/л 6-БАП. Микрорастения укореняли на среде МС с половинным содержанием микро- и макроэлементов, дополненной 1,0 мг/л ИУК. Переводу регенерантов в почвенную культуру предшествовало выращивание в контейнерах со стерильным песком, затем в горшках с субстратом, состоящим из смеси торфа с перлитом, перегноя, песка и кокосового субстрата (1:1:0,5:0,5). Дальнейшие исследования проводили в 2015-2021 годах на экспериментальном участке ЦСБС, расположенном в лесостепной зоне юга Западной Сибири (г. Новосибирск, Академгородок), которая характеризуется континентальным климатом. При изучении морфогенеза использовали классические и современные биоморфологические подходы, которые рассматривают кустарниковую форму роста как совокупность систем побегов формирования (СПФ) в пространстве и смену этих систем во времени. Сезонную динамику крахмала в побегах исследовали с помощью реакции с йодом в йодистом калии. Учитывали семенную продуктивность. На этапе собственно микроразмножения на средах с 1,0 мг/л 6-БАП получили 8±1 микропобегов на эксплант. При укоренении регенерантов на среде МС с половинным содержанием микро- и макроэлементов и 1,0 мг/л ИУК частота ризогенеза равнялась 60 %, число корней, развившихся у каждого микропобега, составило в среднем 2±1. Выявлено, что прегенеративный период у *R. canina* микроклонального происхождения сокращается на год, в онтогенетическое состояние g1 особи вступают на третий год, а образование парциальных кустов, которые могут быть использованы для пополнения семенных плантаций, начинается на четвертый год вегетации. В условиях континентального климата лесостепи Западной Сибири у всех особей отборной формы, размноженных in vitro, было отмечено ежегодное плодоношение на побегах выше снегового покрова. Исключением была зимовка 2020-2021 годов, однако даже после суровой зимовки гипантии сформировались в нижней части СПФ. Продолжительное снижение температуры до –30 °С в декабре приводило к частичному повреждению средней части СПФ, кратковременное снижение температуры воздуха до –28 °С в январе не наносило серьезных повреждений даже средней части СПФ. Отборная форма оказалась также устойчива к сильным весенним заморозкам во II декаде мая. При благоприятных зимовках и сохранении терминальных почек СПФ зрелых генеративных растений (g2) продолжала нарастать в высоту. Сочетание двух благоприятных зимовок подряд привело к образованию и сохранению мощных СПФ до 2 м высотой, а также к формирова-

* Работа выполнена в рамках государственного задания Центрального сибирского ботанического сада СО РАН — Проекта «Анализ биоразнообразия, сохранение и восстановление редких и ресурсных видов растений с использованием экспериментальных методов» (номер госрегистрации АААА-А21-121011290025-2).

нию на укороченных плодовых побегах преимущественно 2-3 гипантиев с высоким числом выполненных семян. Гидролиз крахмала у тех побегов *R. canina*, у которых в октябре отмечалось полное опадение листьев (фенофаза Л5), практически завершался в ноябре, однако единичные крахмальные зерна еще находились в однорядных и многорядных сердцевинных лучах, а также перимедуллярной зоне.

Ключевые слова: *Rosa canina*, клональное микроразмножение, онтогенез, парциальный куст, семенная продуктивность, гистохимические исследования, лесостепь Западной Сибири.

Садовые розы традиционно выращиваются в привитой культуре (1-4). В Сибири нет естественных местообитаний наиболее широко используемого подвоя *Rosa canina* L., который произрастает в Европе, Западной и Средней Азии, Северной Африке, в Крыму и на Кавказе. Восточная граница ареала этого вида не достигает Камы (5).

Основная проблема состоит в том, что подземная часть подвоя *R. canina* обладает высокой зимостойкостью, тогда как надземная побеговая система даже в лесостепи Западной Сибири часто получает серьезные повреждения в результате зимовок. Можно успешно выращивать сеянцы подвоя *R. canina* из семян, собранных в естественных местообитаниях с более мягким климатом, однако получение семян местной репродукции в промышленных масштабах в регионе не гарантировано.

Неоднократные попытки использовать на Урале и в Западной Сибири в качестве подвоев шиповники местной флоры (*R. acicularis* Lindl., *R. majalis* Herrm.), а также наиболее зимостойкие шиповники-интродуценты (*R. rugosa* Thunb.) показали неперспективность этих видов. Для всех них характерно наличие большого числа шипов и мелких шипиков на побегах, чрезвычайно затрудняющих прививку и окулировку, а также высокое порослеобразование, угнетающее в дальнейшем сортовую привойную часть. К числу особенностей *R. acicularis* и *R. majalis* также относятся непродолжительный период хорошего отделения коры, связанный с сокодвижением, и тонкая, лопающаяся кора в зоне прививки (6).

Согласно зарубежным таксономическим и молекулярно-генетическим исследованиям (7-9), *R. canina* — чрезвычайно полиморфный вид с широким ареалом, что позволяет проводить поиск и отбор форм ex situ, перспективных в конкретных эколого-географических условиях как в качестве подвоя, так и в качестве лекарственного растения (10-12). За пределами естественного ареала, в условиях более комфортного, чем континентальный, муссонного климата Российского Дальнего Востока отмечены случаи натурализации интродуцента *R. canina* (13).

В Центральном сибирском ботаническом саду СО РАН (ЦСБС, г. Новосибирск) проведены многолетние исследования сезонного развития, онтогенеза, биоморфологии, репродуктивной биологии и зимостойкости видов шиповников из секций *Caninae* Crép., *Indicae* Thory, *Synstylae* DC. и *Cinnamomeae* DC. Благодаря особому типу *Caninae*-мейоза (14), а также склонности *R. canina* и *R. corymbifera* к автогамии и факультативному апомиксису (15), семенное потомство отборных форм этих видов характеризуется матроклинностью. Наиболее эффективно решить проблему ускоренного размножения зимостойких высокопродуктивных форм можно при использовании клонального микроразмножения. Зарубежными биотехнологами описан положительный опыт размножения in vitro некоторых видов (16-18) и культиваров (19-21) роз.

В настоящей работе впервые приведены результаты многолетнего

изучения зимостойкости и семенной продуктивности отборной высокозимостойкой формы *Rosa canina*, размноженной in vitro, дана оценка состояния системы побегов формирования после экстремальных зимовок. Выявлено, что после экстремальных зимовок растения отборной формы не переходят в категорию «временно не цветущих».

Целью работы была оценка адаптивного потенциала перспективной зимостойкой формы *Rosa canina*, введенной в культуру in vitro.

Методика. Размножение зимостойкой формы *R. canina*, используемой в качестве подвоя для садовых роз, осуществляли с помощью микроклонирования.

Растения исходных интродукционных популяций *R. canina* были выращены из семян, собранных в естественных местообитаниях в Кабардино-Балкарии. Сначала отбор лучших двухлетних особей семенного происхождения проводили по энергии роста в прегенеративный период, зимостойкости, умеренному образованию побегов возобновления, устойчивости к грибным болезням. Далее отмечали образцы с наибольшей урожайностью плодов-гипантиев и регулярным плодоношением. Выделенные зимостойкие формы (в частности, *R. canina* № 23 и *R. canina* № 39) использовали для сравнения при дальнейших отборах. Для анализа ритмов роста и развития, степени подготовленности растений *R. canina* к зимовке в сравнительные исследования привлекался также вид местной флоры *R. majalis* Herrm.

Эксперименты in vitro проводили на отборной зимостойкой форме, выделенной в ЦСБС из растений F_3 местной репродукции. Первичными эксплантами служили меристемы с двумя листовыми примордиями, изолированные из пазушных почек однолетних вегетативных побегов. На этапе введения в культуру in vitro экспланты культивировали в течение 3 сут на жидкой питательной среде по прописи Мурасиге-Скуга (МС), дополненной 100,0 мг/л глутатиона и 30,0 г/л глюкозы (22, 23). Для индукции прямого органогенеза использовали среду МС с 2,0 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП) и 1,0 мг/л 3-индолилуксусной кислоты (ИУК). Собственно микроразмножение регенерантов проводили на среде МС с 1,0 мг/л БАП. Микрорастения укореняли на среде МС с половинным содержанием микро- и макроэлементов, дополненной 1,0 мг/л ИУК. Переводу регенерантов в почвенную культуру предшествовало выращивание в контейнерах со стерильным песком, затем в горшках с субстратом, состоящим из смеси торфа с перлитом, перегноя, песка и кокосового субстрата (1:1:0,5:0,5) (24).

Дальнейшие исследования проводили в 2015-2021 годах на экспериментальном участке ЦСБС, расположенном в лесостепной зоне юга Западной Сибири (г. Новосибирск, Академгородок), которая характеризуется континентальным климатом. Метеорологические условия вегетации и зимовки анализировали на основании данных ближайшей к Центральному сибирскому ботаническому саду ГМС (пос. Огурцово, г. Новосибирск).

Растения из горшков с субстратом пересаживали в открытый грунт. Фенологические наблюдения осуществляли согласно описанной методике (25).

При изучении морфогенеза использовали классические и современные биоморфологические подходы (26, 27), которые рассматривают кустарниковую форму роста как совокупность систем побегов формирования (СПФ) в пространстве и смену этих систем во времени. В надземной части куста выделяли побеги кущения, стеблевые и корневищные, в подземной —

ксилоподии и ксилоризомы (28). Динамику побегообразования оценивали на 15 растениях. Качественные признаки онтогенетических состояний описывали на основании шкалы периодизации онтогенеза (29).

Сезонную динамику содержания крахмала в побегах исследовали с помощью реакции с йодом в йодистом калии. Состав реактива был следующим: 2 г йодистого калия, 0,2 г кристаллического йода и 100 мл дистиллированной воды (30). Для приготовления микропрепаратов использовали санный микротом МС-2 («Спектро Лаб», Украина) с термоохлаждающим столиком ТОС-II («Точмедприбор», Украина), световой микроскоп Carl Zeiss Axioscop-40 («Carl Zeiss», Германия), видеокамеру AxioCam MRc-5 («Carl Zeiss», Германия) с программой для получения и обработки изображений AxioVision 4.8 («Carl Zeiss», Германия, https://carl-zeiss-axiovision-rel.software.informer.com). При учете семенной продуктивности использовались методические указания по семеноведению интродуцентов (31), а также собственные разработки (32). Семенную продуктивность у изучаемых форм *R. canina* оценивали по 20 плодам-гипантиям.

Статистическую обработку данных осуществляли по Б.А. Доспехову (33) в программе Microsoft Excel 2003. Использовались формулы для вычисления статистических характеристик выборки при количественной изменчивости признаков: рассчитывали средние арифметические значения (*M*), ошибки средних (±SEM), коэффициенты вариации (*Cv*).

Результаты. Особенности морфогенеза отборной зимостойкой формы *R. canina*, характеризующейся технологически ценным малым числом шипов на побегах (рис. 1, а), изучали в условиях in vitro у почек, взятых в сентябре-октябре, поскольку у них наблюдалась максимальная частота побегообразования (62,0 %).

Соотношение 2,0 мг/л 6-БАП и 1,0 мг/л ИУК в сочетании с глутатионом в нулевом пассаже позволило получить к концу первого пассажа (через 6 нед культивирования) жизнеспособные микропобеги. Регенерация микропобегов из меристем пазушных почек происходила по периферии их основания (см. рис. 1, б). В среднем образовывалось около трех побегов на эксплант. На этапе собственно микроразмножения на средах с 1,0 мг/л 6-БАП число микропобегов на эксплант составило 8±1 (см. рис. 1, в). При укоренении регенерантов на среде МС с половинным содержанием микро- и макроэлементов и 1,0 мг/л ИУК с частотой ризогенеза 60 % у каждого микропобега развивалось в среднем 2±1 корней (см. рис. 1, г, д).

Приживаемость растений-регенерантов в условиях ex vitro составила 95-100 %, при этом растения характеризовались хорошим развитием надземной части и корневой системы (число корней — 2-4 шт., длина — 2,5-7,5 см) (см. рис. 1, е, ж). У растений с такими морфологическими характеристиками (см. рис. 1, з) изучали их онтоморфогенез и репродуктивную биологии in vivo.

Первый этап исследования позволил в короткий срок размножить высокозимостойкую форму в количестве, необходимом для проведения экспериментов и создания семенной плантации с минимальным использованием побегового материала. Прегенеративный период у *R. canina* микроклонального происхождения сокращался на год, в онтогенетическое состояние g1 особи вступали на третий год, а образование парциальных кустов, которые могут быть использованы для пополнения семенных плантаций, начиналось на четвертый год вегетации. При семенном размножении по-

требовалось бы еще 1-2 года на стратификацию семян.

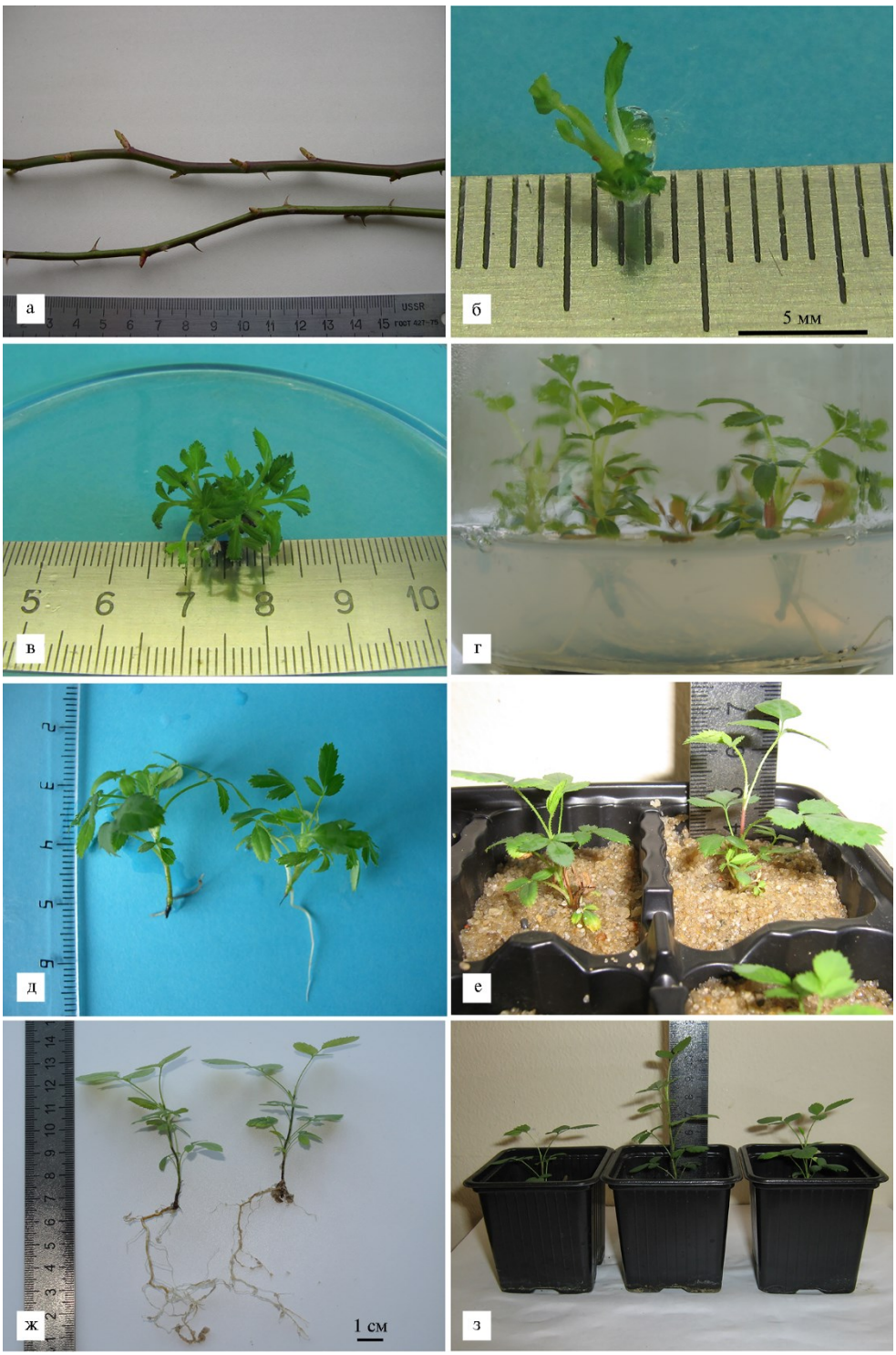

Рис. 1. Клональное микроразмножение отборной зимостойкой формы *Rosa canina* L.: а — однолетние вегетативные побеги, исходный материал для введения в культуру in vitro, б — формирование микропобегов из меристем пазушных почек побегов через 4 нед культивирования на индукционной среде Мурасиге-Скуга (МС) с 2,0 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП) и 1,0 мг/л 3-индолилуксусной кислоты, в — микропобеги через 6 нед микроразмножения на среде МС с 1,0 мг/л 6-БАП, г — укоренение регенерантов на среде $^1/_2$ МС с 1,0 мг/л ИУК, д — микро-

растения через 6 нед культивирования на среде для укоренения, е — адаптация регенерантов в условиях ex vitro в стерильном песке, ж — растения-регенеранты через 4 нед адаптации в стерильном песке, з — растения-регенеранты в субстрате из смеси торфа с перлитом, перегноя, песка и кокосового субстрата (1:1:0,5:0,5) через 4 нед адаптации.

Второй этап работы был необходим в связи с тем, что метеорологические условия и повреждающие факторы во время почти полугодовых зимовок в условиях лесостепи Западной Сибири весьма различаются по годам. Для этой зоны характерно резкое понижение температуры в ноябре до –20...–25 °С, продолжительные декабрьские и январские морозы ниже –35 °С, недостаточное накопление твердых осадков в первой половине зимовки. Многолетние исследования, проведенные нами, позволили охватить все проблемные периоды зимовок и составить наиболее полное представление об адаптивном потенциале отборной зимостойкой формы *R. canina*. Особое внимание уделялось развитию и сохранению систем побегов формирования после зимовок в зависимости от метеорологических условий. Также для достижения фенофазы Пб2 (окончание линейного роста побегов и заложение терминальной почки) важное значение имели гидротермические условия со II декады сентября по III декаду октября.

1. Метеорологическая характеристика зимних периодов 2015-2021 годов в условиях континентального климата лесостепи Западной Сибири (г. Новосибирск)

Месяц	Температура воздуха, °С								Осадки, мм		
	декада						среднемесячная	отклонение от нормы	декада		
	I		II		III				I	II	III
	средняя	min	средняя	min	средняя	min					
2015 год											
Ноябрь	–2,0	–10,8	–14,3	–21,1	–8,4	–24,9	–8,2	–0,6	6,0	0,0	30,0
Декабрь	–4,2	–15,1	–6,4	–17,7	–7,3	–27,1	–6,0	7,9	9,0	7,0	32,0
2016 год											
Январь	–20,2	–29,3	–20,2	–34,8	–18,2	–29,7	–19,5	–2,7	1,0	5,0	0,0
Февраль	–6,8	–19,6	–14,8	–26,3	–6,3	–20,3	–9,3	6,3	10,0	4,0	0,5
Ноябрь	–6,1	–20,8	–22,3	–33,2	–10,2	–31,7	–12,9	–5,3	21,0	6,0	19,0
Декабрь	–10,4	–26,5	–9,4	–22,0	–16,6	–36,1	–12,1	1,8	23,0	19,0	11,0
2017 год											
Январь	–8,9	–29,2	–19,2	–29,5	–15,1	–31,9	–14,4	2,4	13,0	6,0	5,0
Февраль	–12,7	–21,0	–20,1	–32,8	–5,0	–16,4	–12,6	3,0	5,0	8,0	4,0
Ноябрь	0,7	–6,9	–7,6	–22,9	–8,8	–24,8	–5,2	2,4	16,0	11,0	7,0
Декабрь	–9,3	–18,1	–17,9	–27,8	–9,7	–24,3	–12,3	1,6	5,0	1,0	33,0
2018 год											
Январь	–20,2	–31,5	–15,7	–31,2	–26,8	–37,4	–20,9	–4,1	3,0	21,0	3,0
Февраль	–14,9	–26,5	–15,4	–27,1	–15,5	–28,3	–15,3	0,3	0,8	3,0	1,0
Ноябрь	–5,7	–22,5	–11,7	–23,0	–7,1	–17,1	–8,2	–0,6	27,0	16,0	27,0
Декабрь	–21,9	–36,5	–12,8	–28,1	–23,5	–35,4	–19,4	–5,5	6,0	11,0	5,0
2019 год											
Январь	–15,5	–27,9	–13,8	–26,6	–14,7	–28,2	–14,7	2,1	3,0	2,0	7,0
Февраль	–30,0	–40,1	–10,4	–25,8	–7,0	–14,7	–15,8	–0,2	0,0	4,0	4,0
Ноябрь	–1,3	–14,8	–13,8	–29,5	–15,2	–28,5	–10,1	–2,5	14,0	14,0	8,0
Декабрь	–6,1	–22,5	–8,2	–13,9	–13,6	–31,6	–9,3	4,6	14,0	14,0	28,0
2020 год											
Январь	–7,9	–22,4	–11,9	–25,8	–11,7	–28,8	–10,5	6,3	11,0	16,0	17,0
Февраль	–7,9	–27,4	–10,8	–29,8	–4,9	–17,2	–7,9	7,7	19,0	7,0	9,0
Ноябрь	2,2	–2,8	–7,0	–20,8	–9,3	–19,4	–4,7	2,9	11,0	18,0	0,2
Декабрь	–16,2	–25,3	–10,5	–21,5	–21,4	–40,0	–16,0	–2,1	10,0	10,0	20,0
2021 год											
Январь	–27,2	–39,3	–19,0	–32,1	–19,1	–41,0	–21,8	–5,0	3,0	6,0	19,0
Февраль	–11,2	–26,3	–16,4	–36,1	–21,5	–32,6	–16,4	–0,8	13,0	12,0	6,0

Как показали наши исследования, для более четкого прогнозирования степени повреждения СПФ необходимо учитывать не только среднедекадную температуру воздуха и суммарное количество твердых осадков за декаду, но и минимальную декадную температуру (табл. 1). Так, средняя температура воздуха в III декаде ноября 2016 года была –10,2 °С, а мини-

мальная опускалась до –31,7 °С. Такое начало зимовки относится к экстремальным, поскольку в течение всей II декады ноября минимальные температуры воздуха были ниже –20 °С, а на протяжении 6 сут опускались даже до –25 °С. Отклонение среднемесячной температуры воздуха от нормы составило –5,3 °С. Окончание вегетационного периода 2016 года с резким понижением температуры в октябре также не способствовало завершению роста годичных побегов и заложению терминальных почек.

После экстремальной зимовки молодые генеративные (g1) растения отборной формы не перешли в состояние «временно не цветущих», хотя СПФ получили повреждения в верхней и частично средней части побегов. Плоды сформировались в нижнем и среднем ярусе СПФ.

Интенсивное образование стеблевых побегов в течение вегетационного периода 2017 года (табл. 2) было следствием гибели верхней и повреждения средней частей осевого побега из-за экстремальной зимовки. Наиболее благоприятное начало зимнего периода отмечалось в ноябре 2017 года и ноябре 2018 года.

2. Структура куста молодых (g1) **и зрелых** (g2) **генеративных растений отборной зимостойкой формы *Rosa canina* L., полученных посредством клонального микроразмножения, в условиях континентального климата лесостепи Западной Сибири** (n = 15, M±SEM; г. Новосибирск, Академгородок)

Год, состояние	СПФ		Побеги кущения		Побеги стеблевые		Парциальный куст	
	число	высота, см	число	высота, см	число	длина, см	число	высота, см
2016, g1	2,13±0,19	128,73±1,52	2,07±0,21	122,60±3,75	0		0	
2017, g2	3,47±0,13	143,13±1,83	2,60±0,67	155,80±2,88	7,33±0,43	45,93±1,42	0,67±0,13	92,80±2,23
2018, g2	5.33±0,32	175,93±3,32	4,13±0,26	159,27±1,12	5,87±0,24	23,33±2,18	2,13±0,09	96,20±1,05
2019, g2	2,13±0,09	119,00±1,50	2,13±0,09	119,00±1,50	2,13±0,09	119,00±1,50	2,13±0,09	119,00±1,50

Примечание. СПФ — система побегов формирования.

Сочетание двух благоприятных зимовок подряд привело к образованию и сохранению мощных СПФ до 2 м высотой, а также к формированию на укороченных плодовых побегах преимущественно 2-3 гипантиев с высоким числом выполненных семян (табл. 3). В питомниководстве плоды-орешки шиповников, образующиеся внутри гипантия, традиционно называют семенами, а собственно гипантий (разросшееся цветоложе) — плодом. Чтобы спрогнозировать выход качественных семян подвоя из собранных плодов, мы проводили подсчет выполненных семян и далее эти показатели соотносили с урожаем собранных плодов у различных отборных форм, включая наиболее зимостойкую.

3. Семенная продуктивность отборных зимостойких форм *Rosa canina* L., полученных посредством клонального микроразмножения, в условиях континентального климата лесостепи Западной Сибири (n = 15; г. Новосибирск, Академгородок)

Возраст растений	Число семян в плоде, шт.				Масса выполненных семян в плоде, г	
	выполненных		недоразвитых			
	M±SEM	Cv, %	M±SEM	Cv, %	M±SEM	Cv, %
	R. canina № 23					
4 года	36,32±0,90	24,3	6,35±0,45	34,2	0,82±0,02	14,3
5 лет	29,72±1,05	35,6	11,40±0,62	42,0	0,86±0,02	11,7
6 лет	32,95±1,16	22,1	7,82±0,56	39,4	0,95±0,02	9,8
	R. canina № 39					
4 года	38,05±1,23	29,7	5,42±0,40	44,5	0,88±0,03	12,0
5 лет	35,21±1,37	19,2	8,10±0,63	32,1	0,94±0,02	8,4
6 лет	32,71±0,90	18,6	7,30±0,47	37,3	0,97±0,03	9,3
	R. canina, отборная форма					
4 года	31,75±1,43	20,5	4,90±0,43	39,6	0,69±0,03	20,3
5 лет	35,30±1,48	18,7	5,20±0,49	42,5	0,84±0,04	21,4
6 лет	34,85±0,95	12,2	5,75±0,44	34,3	0,91±0,04	19,8

У зимостойкой формы при благоприятных зимовках и сохранении терминальных почек СПФ зрелых генеративных растений (g2) продолжала нарастать в высоту. Как показали многолетние исследования, СПФ отборной формы *R. canina* были наиболее неустойчивы к низким отрицательным температурам в ноябре, когда процесс перехода в состояние зимнего покоя еще не завершен.

Гистохимическая экспресс-диагностика подготовленности шиповников к зимовке проводилась с учетом того, что к началу листопада в тканях побегов содержится осенний максимум крахмала. В октябре-ноябре у зимостойких видов и форм наиболее полно происходит гидролиз крахмала, причем в тканях это имеет центростремительный характер: он наблюдается в однорядных и многорядных сердцевинных лучах, перимедуллярной зоне и сердцевине, но уже отсутствует в коровой паренхиме, флоэме, камбии и ксилеме (6).

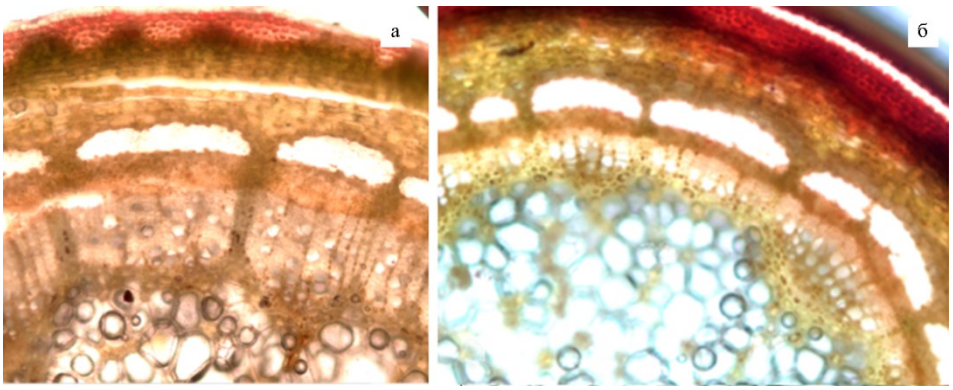

Рис. 2. Содержание крахмала в тканях годичных побегов *Rosa canina* L. (а) **и *R. majalis* Herrm.** (б) **в предзимнем состоянии** (г. Новосибирск, Академгородок, ноябрь 2021 года; реакция с йодом в йодистом калии, увеличение ×40, световой микроскоп Carl Zeiss Axioscop-40, «Carl Zeiss», Германия; видеокамера AxioCam MRc-5, «Carl Zeiss», Германия, с программой для получения и обработки изображений AxioVision 4.8, «Carl Zeiss», Германия, https://carl-zeiss-axiovision-rel.software.informer.com).

У тех побегов *R. canina*, у которых в октябре отмечалось полное опадение листьев (фенофаза Л5), гидролиз крахмала практически завершался в ноябре, единичные крахмальные зерна еще находились в однорядных и многорядных сердцевинных лучах, а также перимедуллярной зоне (рис. 2, а). У высокозимостойкого местного вида *R. majalis*, который используется в исследованиях как контрольный, единичные крахмальные зерна были обнаружены только в перимедуллярной зоне (см. рис. 2, б). Следовательно, у обоих видов содержание крахмала в тканях было минимальным и оценивалось в 1 балл. В ранее проведенных в ЦСБС гистохимических исследованиях побегов *R. canina* в предзимье (6, 34) были выявлены различия по динамике крахмала даже среди достаточно зимостойких форм: крахмальные зерна в однорядных и многорядных сердцевинных лучах могли находиться менее чем в 50 % клеток, что соответствует 2 баллам.

Продолжительное (более 2 сут) снижение температуры до –30 °С в декабре приводило к частичному повреждению средней части СПФ. Кратковременное (на несколько часов в течение дня) снижение температуры в диапазоне от –25 до –28 °С в январе не наносило серьезных повреждений даже средней части СПФ (например, зимой 2018-2019 годов).

К числу экстремальных относилась и зимовка 2020-2021 годов, во время которой в III декаде декабря, а также в I и III декадах января мини-

мальная температура опускалась до –41 °С. В результате погибли верхняя и частично средняя части СПФ. Отрицательное влияние на развитие генеративной сферы многих плодовых культур, а также гибель цветков сортов винограда и актинидии в начале вегетационного периода 2021 года в условиях Новосибирска также оказали сильные заморозки 20 (–3,2 °С) и 21 мая (–6,0 °С). В эти дни показатели среднесуточной температуры были на 6,8 и 8,5 °С ниже нормы. Тем не менее в базальной и средней части СПФ на укороченных плодовых побегах отборной формы *R. canina* образовались преимущественно единичные гипантии, что подтверждает высокую зимостойкость и морозостойкость (рис. 3, а).

Рис. 3. Зрелые генеративные растения (g2) **отборной формы *Rosa canina* L.:** а — плодоношение в нижней части системы побегов формирования после экстремальной зимовки, б — парциальный куст (г. Новосибирск, Академгородок, 2021 год).

Семенной материал, как правило, предназначен для получения саженцев подвоев-шиповников в промышленных масштабах, а для скорейшего расширения маточных плантаций перспективно использовать парциальные кусты. Изученная отборная форма характеризовалась ускоренным образованием парциальных кустов (см. рис. 3, б), что служило одним из маркерных признаков перехода в зрелое генеративное состояние (g2).

Создание исходных интродукционных популяций *R. canina* посредством двухэтапного отбора позволило вести дальнейший отбор зимостойких высокопродуктивных форм среди растений, выращенных из семян местных репродукций. Уже при анализе отборных форм, выращенных из семян первой местной репродукции, была доказана перспективность работ в этом направлении. Сравнение данных по урожайности лучших форм *R. canina* в ЦСБС и в одном из питомников Голландии (35) в пересчете на урожай с одного куста показало, что отдельные формы *R. canina* в период максимального плодоношения в местных условиях имеют столь же высокую продуктивность, как в голландском высокоспециализированном хозяйстве.

Анализ исследований, проводимых с подвоями-шиповниками за рубежом (1, 7, 10), показал, что проблемы повышения зимостойкости подвоев в условиях умеренно континентального и более мягкого климата неактуальны. Основные отборы проводятся на устойчивость к грибным заболеваниям, а также решаются вопросы преодоления глубокого покоя семян. Исследования, проводимые в ЦСБС и связанные с выделением зимостойких форм подвоев садовых роз с высокой семенной продуктивностью, имеют большое значение для регионов с суровыми климатическими условиями и позволяют не проводить массовые закупки саженцев подвоя в южных регионах России и СНГ. Выявленные в процессе исследований особенности репродуктивной биологии шиповников (15) представляют более широкий тео-

ретический интерес. В экологическом плане также будет иметь значение оценка адаптивного потенциала, проведенная по многим показателям, в частности с использованием гистохимических исследований с применением современного приборного парка с цифровой обработкой изображений.

Таким образом, максимальную частоту побегообразования (62,0 %) у отборной зимостойкой формы *Rosa canina* отмечали у почек, взятых в сентябре-октябре. Выявлено, что прегенеративный период у *R. canina* микроклонального происхождения сокращается на год по сравнению с растениями семенного происхождения, поэтому в онтогенетическое состояние g1 (молодое генеративное) особи вступают на третий год вегетации. Парциальные кусты, которые могут быть использованы для пополнения семенных плантаций, формируются на четвертый год вегетации. В условиях континентального климата лесостепи Западной Сибири у всех особей отборной формы, размноженных in vitro, отмечали ежегодное плодоношение на побегах выше снегового покрова. Исключением была зимовка 2020-2021 годов, однако даже после суровой зимовки гипантии образовались в нижней части систем побегов формирования. Важная особенность феноритмики отборной формы *R. canina* — способность заканчивать рост и закладывать терминальную почку на большинстве побегов текущего года, то есть полноценно подготавливаться к зимовке, что подтверждают гистохимические исследования динамики содержания крахмала.

ФГБУН Центральный сибирский ботанический сад СО РАН,
630090 Россия, г. Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101,
e-mail: vasil.flowers@ramber.ru ✉, ambros_ev@mail.ru,
margareta23@inbox.ru

Поступила в редакцию 19 апреля 2022 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [*Agricultural Biology*], 2022, V. 57, № 3, pp. 579-590

THE ADAPTIVE POTENTIAL OF THE *Rosa canina* L. ROOTSTOCK OBTAINED in vitro IN THE CONDITIONS OF THE SOUTH OF WESTERN SIBERIA

O.Yu. Vasilyeva✉, E.V. Ambros, M.V. Kozlova

Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch RAS, 101, ul. Zolotodolinskaya, Novosibirsk, 630090 Russia, e-mail vasil.flowers@ramber.ru (✉ corresponding author), ambros_ev@mail.ru, margareta23@inbox.ru
ORCID:
Vasilyeva O.Yu. orcid.org/0000-0003-0730-3365 Kozlova M.V. orcid.org/0000-0002-3347-5948
Ambros E.V. orcid.org/0000-0002-2119-6503
The authors declare no conflict of interests
Acknowledgements:
The work was carried out within the framework of the state task of the Central Siberian Botanical Garden SB RAS (the Project "Analysis of biodiversity, conservation and restoration of rare and resource plant species using experimental methods", state registration number AAAA-A21-121011290025-2).
Received April 19, 2022 doi: 10.15389/agrobiology.2022.3.579eng

Abstract

Garden roses are reproduced by grafting cultivars on resistant rootstocks, predominantly intraspecific forms of *Rosa canina* L. The underground part of these rootstocks is winter-hardy even in the forest-steppe and southern taiga of Western Siberia. However, their shoot systems of formation (SSF), on which generative shoots are formed, related to the type of shortened fruit, are damaged during the wintering period. After extreme wintering, *R. canina* plants of ontogenetic states g1-g3 for one year can pass into the state of "temporarily non-flowering". In the Central Siberian Botanical Garden of the SB RAS (CSBG, Novosibirsk), long-term studies of seasonal development, ontogenesis, biomorphology, reproductive biology and winter hardiness of wild rose species from the *Caninae* Crép sections are carried out. For the first time, the results of a long-term study of winter hardiness and seed productivity of the selected form of *R. canina* were presented, and an assessment of the SSF after extreme wintering, characterized by various damaging factors, were carried out. The aims of the present

study were to establish in vitro conditions and propagate through direct organogenesis a promising winter-hardy form of *R. canina* used as a rootstock for garden roses, as well as to assess the adaptive potential of plants obtained by micropropagation under continental climate. In vitro experiments were carried out on a winter-hardy form selected in the CSBG from F_3 plants of local reproduction. The primary explants were meristems with two leaf primordia isolated from axillary buds of annual vegetative shoots. At the establishment stage the explants were cultured on hormone-free modified liquid Murashige and Skoog's medium (MS) supplemented with 100.0 mg/l glutathione and 30.0 g/l glucose. Direct organogenesis was induced on MS medium supplemented with 2.0 mg/l 6-benzylaminopurine (BAP) and 1.0 mg/l 3-indoleacetic acid (IAA). MS medium with 1.0 mg/l BAP was used for shoot multiplication. A hormone-free half-strength MS medium supplemented with 1.0 mg/l IAA was used to root the obtained microshoots. The regenerants were grown in containers with sterile sand, then in pots with a substrate consisting of a mixture of peat with perlite, humus, sand, and coconut substrate (1:1:0.5:0.5) and transferred to soil culture. Further studies were carried out in 2015-2021 on the experimental plot of the CSBG, located in the forest-steppe zone of the south of Western Siberia (Novosibirsk, Akademgorodok), which is characterized by a continental climate. In the study of morphogenesis, classical and modern biomorphological approaches were used, which consider the shrub form as a complex shoot systems of formation in space and the change of these systems in time. The seasonal dynamics of starch in the shoots was studied using a reaction with iodine in potassium iodide. Seed productivity was determined. At the multiplication stage, 8±1 microshoots per explant on MS media with 1.0 mg/l BAP was obtained. The in vitro rooting frequency was 60.0 % with a mean number of 2.0±1.0 roots per microshoot on half-strength MS with 1.0 mg/l IAA. It was revealed that the pregenerative period in vitro-derived *R. canina* plants is reduced by a year, compared with ones of seed origin. Plants enter the ontogenetic state g1 in the third year, and the formation of partial bushes, which can be used to seed plantations, begins in the fourth year of vegetation. Under the conditions of the continental climate of the forest-steppe of Western Siberia, all in vitro-derived specimens of the selected form had annual fruiting on shoots above the snow cover. The exception was 2020-2021, however, even after a severe wintering, hypanthia formed in the lower part of the SSF. A prolonged decrease in temperature to –30 °C in December led to partial damage to the middle part of the SSF, while a short-term decrease in air temperature to –28 °C in January did not cause serious damage even to the middle part of the SSF. The selected form was also resistant to strong spring frosts in the second decade of May. With favorable wintering and the preservation of terminal buds, the SSF of mature generative plants (g2) continued to increase in height. The combination of two favorable wintering periods in a series led to the formation and preservation of powerful SSF up to 2 m tall, as well as to the formation of mainly 2-3 hypanthia with a high number of completed seeds on short fruit shoots. Starch hydrolysis in those shoots of *R. canina*, in which complete leaf fall was observed in October (phenophase L5), was almost completed in November. However, single starch grains were still in single-row and multi-row medullary rays, as well as in the perimedullary zone.

Keywords: *Rosa canina*, clonal micropropagation, ontogenesis, partial bush, seed productivity, histochemical studies, forest-steppe of Western Siberia.

REFERENCES

1. Balaj N.X., Zogaj R. Production seedlings of roses by grafting with bud for hybrid teas and climbing roses cultivars. *Research Journal of Agricultural Science*, 2011, 43(2): 155-160.
2. Shagapov R.Sh., Shagapov R.R. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2016, 2(58): 144-145 (in Russ.).
3. Plugatar Yu.V., Klimenko Z.K., Zykova V.K., Plugatar S.A. Methods and results of roses' breeding from different garden groups in the south of Russia. *Acta Horticulturae*, 2019, 1255: 31-34 (doi: 10.17660/ActaHortic.2019.1255.6).
4. Plugatar S., Klimenko Z., Zykova V., Kuzmenko D. Reproductive traits of some hybrid tea rose cultivars from the collection of the Nikita botanical gardens. *Acta Horticulturae*, 2021, 1324: 159-164 (doi: 10.17660/ActaHortic.2021.1324.24).
5. Khrzhanovskiy V.G. *Rozy* [Roses]. Moscow, 1958.
6. Vasil'eva O.Yu. *Biologicheskie osobennosti vidov roda Rosa L., introdutsiruemykh v kachestve podvoev v Zapadnoy Sibiri. Doktorskaya dissertatsiya* [Biological features of species of the genus *Rosa* L. introduced as rootstocks in Western Siberia. DSc Thesis]. Novosibirsk, 2002 (in Russ.).
7. Werlemark G., Nybom H. Dogroses: botany, horticulture, genetics, and breeding. In: *Horticultural Review. Vol. 36*. J. Janick (ed.). John Wiley, New Jersey, 2010 (doi: 10.1002/9780470527238.ch4).
8. Verma M.K., Lal S., Nazeer A., Sagoo P.A. Character association and path analysis in hip rose (*Rosa* sp.) accessions collected from North Western Himalyan region of Kashmir. *African Journal Agricultural Research*, 2013, 8(39): 4949-4955 (doi: 10.5897/AJAR2013.6950).
9. Üzün I., Bayir A. Horticultural biodiversity in Turkey. *Bulletin UASVM Horticulture*, 2009, 66: 536-543 (doi: 10.15835/buasvmcn-hort:4418).

10. Iakovoglou V., Radoglou K. Breaking seed dormancy of three orthodox Mediterranean *Rosaceae* species. *Journal Environmental Biology*, 2015, 36(2): 345-349.
11. Izadi Z., Zarei H., Alizadeh M. Studies on vegetative propagation of *Rosa canina*. *Indian Journal of Horticulture*, 2012, 69(4): 598-601.
12. Jürgens A., Seitz B., Kowarik I. Genetic differentiation of *Rosa canina* (L.) at regional and continental scales. *Plant Syst. Evol.*, 2007, 269: 39-53 (doi: 10.1007/s00606-007-0569-3).
13. Kozhevnikova Z.V., Kozhevnikov A.E. *Komarovskie chteniya*, 2017, 65: 89-102 (in Russ.).
14. Grant V. *Plant speciation. 2nd ed.* Columbia University Press, New York, NY, 1981.
15. Vasil'eva O.Yu. Reproduction systems of representatives of the genus *Rosa* L. under condition of continental climate. *Contemporary Problems of Ecology*, 2009, 2(4): 361-368 (doi: 10.1134/S1995425509040109).
16. Elliott R.F. Axenic culture of meristem tips of *Rosa mutiflora*. *Planta*, 1970, 95: 183-186 (doi: 10.1007/BF00387250).
17. Walter R.J., Kamp M., Smith R.H. In vitro propagation of *Rosa chinensis* Jacq. Red Cascade. *Journal of the Rio Grande Valley Horticultural Society*, 1979, 33: 125-127.
18. Voyiatzi C., Voyiatzis D.G., Tsiakmaki V. In vitro shoot proliferation rates of the rose cv. (hybrid tea) 'Dr. Verhage', as affected by apical dominance regulating substances. *Scientia Horticulturae*, 1995, 61(3-4): 241-249.
19. Marković M., Đunisijević-Bojović D., Skočajić D., Milutinović M., Buvač K. Optimizing the micropropagation protocol for *Rosa canina* L. elite genotype propagation in the Belgrade area. *Glasnik Sumarskog fakulteta*, 2021, 123: 87-96 (doi: 10.2298/GSF2123087M).
20. Badzian T., Hennen G.R., Fotyma-Kern J. In vitro rooting of clonal propagated miniature rose cultivars. *Acta Hortic.*, 1991, 289: 329-330 (doi: 10.17660/ActaHortic.1991.289.81).
21. Canli F.A., Kazaz S. Biotechnology of roses progress and future prospects. *Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi (Seri: A)*, 2009, 1: 167-183.
22. Shirdel M., Motallebi-Azar A., Matloobi M., Zaare-Nahandi F. Effects of nodal position and growth regulators on in vitro growth of dog rose (*Rosa canina*). *Journal of Ornamental and Horticultural Plants*, 2013, 3(1): 9-17.
23. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 1962, 15(3): 473-497 (doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x).
24. Ambros E.V., Vasilyeva O.Yr., Novikova T.Iv. Effects of in vitro propagation on ontogeny of *Rosa canina* L. micropropagated plants as a promising rootstock for ornamental roses. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 2016, 17(1-2): 72-78.
25. *Metodika fenologicheskikh nablyudeniy v botanicheskikh sadakh SSSR* [Methods of phenological observations in the botanical gardens of the USSR]. Moscow, 1975 (in Russ.).
26. Mazurenko M.T., Khokhryakov A.P. *Struktura i morfogenez kustarnikov* [Structure and morphogenesis of shrubs]. Moscow, 1977 (in Russ.).
27. Savinykh N.P., Cheryomushkina V.A. Biomorphology: current status and prospects. *Contemporary Problems of Ecology*, 8: 541-549 (doi: 10.1134/S1995425515050121).
28. Vasil'eva O.Yu. *Byulleten' Moskovskogo obshchestva ispytateley prirody. Otdel biologicheskiy*, 2007, 112(3): 53-57 (in Russ.).
29. *Ontogeneticheskiy atlas rasteniy* /L.A. Zhukova (otvetstvennyy redaktor) [Ontogenetic atlas of plants. L.A. Zhukova (ed.)]. Yoshkar-Ola, 2013 (in Russ.).
30. Vasil'eva O.Yu. *Sadovodstvo i vinogradarstvo*, 2016, 3: 29-34 (doi: 10.18454/VSTISP.2016.3.1919) (in Russ.).
31. *Metodicheskie ukazaniya po semenovedeniyu introdutsentov* [Guidelines for seed production of introducers]. Moscow, 1980 (in Russ.).
32. Kozlova M.V., Vasil'eva O.Yu., Yudanova S.S. *Vestnik KrasGAU*, 2020, 5: 24-30 (doi: 10.36718/1819-4036-2020-5-24-30) (in Russ.).
33. Dospekhov B.A. *Metodika polevogo opyta (s osnovami statisticheskoy obrabotki rezul'tatov issledovaniy)*. 5-e izd., dop. i pererab [Methods of field trials]. Moscow, 1985 (in Russ.).
34. Kozlova M.V. *Samarskiy nauchnyy vestnik*, 2021, 10(4): 61-67 (in Russ.).
35. Rosenunterlagen: Mutter Pflanzen sollten nicht stiefmьtterlich behandelt werden. *Dt. Baumschule*, 1979, 31(7): 254-255 (tsit. po Korobov V.I. *Rozy v otkrytom grunte Zapadnoy Sibiri* [Roses in the open ground of Western Siberia]. Novosibirsk, 1981.