

УДК 58.085:582.639

Особенности формирования придаточных корней у сортов роз, относящихся к разным садовым группам

Peculiarities of adventitious roots forming of *Rosa* cultivars from different garden groups

Креницына А. А., Чурикова О. А.

Krinitcina A. A., Churikova O. A.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Биологический факультет, г. Москва, Россия.
E-mail: ochurikova@yandex.ru

Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty, Moscow, Russia

Реферат. При сравнительном анализе анатомических изменений базальной части микропобегов легко ('Nina Weibull', группа флорибунда) и трудно ('Rosarium Uetersen', группа плетистые) укореняемых сортов роз при воздействии экзогенного ауксина (в стерильной культуре) было показано, что сорт 'Nina Weibull' отличается более ранним и интенсивным, по сравнению с другим сортом, заложением корней. При этом именно у этого сорта наблюдается увеличение уровня экспрессии гена *PIN2*, связанного с транспортом ауксинов, в период интенсивного роста зачатков придаточных корней. Изменений в экспрессии гена *PIN1* нами обнаружено не было.

Summary. The comparative analysis of the anatomical changes in the basal part of the microshoots of easily rooted ('Nina Weibull' group of floribunda roses) and difficultly rooted ('Rosarium uetersen', group of climbing roses) *Rosa* cultivars when exposed to exogenous auxins (in sterile culture) showed earlier and more intensive rooting of the 'Nina Weibull' microshoots, in comparison with other cultivar. Just in this cultivar the increasing in the level of expression of the *PIN2* gene associated with the transport of auxins occurs during the period of intensive growth of adventitious roots primordia. Expression of the *PIN1* gene did not change.

Для многих декоративных видов растений на сегодняшний день выведено большое количество сортов, генотип которых может довольно сильно отличаться между собой. Так, многочисленные сорта роз (*Rosa* L.) подразделяют на несколько садовых групп, которые имеют разные формы (плетистые, флорибунда, миниатюрные и др.). Современный сортимент роз создавался в течение нескольких столетий, скрещивание отдельных видов и сортов происходило многократно, и сорта роз очень разнородны не только по своим ботаническим признакам, но и нередко отличаются способностью к черенкованию, укоренению и др. Способность к укоренению черенков у разных садовых групп и сортов роз различна и колеблется в достаточно широких пределах. Высокий процент укоренения характерен для миниатюрных, плетистых и полуплетистых роз (90–100 %), удовлетворительный – для сортов группы флорибунда, полиантовых, чайно-гибридных и ремонтантных, а также гибридов *Rosa alba* L. и *R. rugosa* Thunb., низкий (5–20 %) – для большинства других парковых роз (Юдинцева, 1965).

Сохранение наиболее ценных сортов роз проводят при помощи культивирования их *in vitro* (Алехно, Высоцкий, 1986). Оно может считаться успешным только при условии укоренения получаемых регенерантов, что является важной предпосылкой и необходимым условием переноса полученных путем микроклонального размножения растений в почву: в природные популяции или в коллекции ботанических садов. Способность к корнеобразованию, в том числе и в культуре *in vitro*, зависит от генотипа растения, внешних (условия культивирования) и внутренних факторов, а также их взаимодействия между собой.

Формирование придаточных корней, в том числе и в стерильной культуре, тесно связано с гормонами ауксинового ряда. Важным фактором является перенос гормонов внутри растений, на что влияют различные гены, продукты которых участвуют в транспорте ауксинов. К ним относится семейство

генов *PIN* (Da Costa et al., 2013). Для *Rosa canina* L. были определены последовательности двух генов, получивших названия *PIN1* и *PIN2*, кодирующих белки, которые непосредственно связаны с корнеобразованием и транспортом ауксина (Jung et al., 2014).

Объектами наших исследований, связанных с особенностями формирования придаточных корней, послужили сорта, относящиеся к различным садовым группам, согласно Международной классификации (Былов и др., 1988): ‘Nina Weibull’ (флорибунда) и ‘Rosarium Uetersen’ (плетистые) – из коллекции розария Ботанического сада МГУ. В качестве первичных эксплантов использовали вегетативные почки с участком стебля длиной 3–4 мм, которые отбирали со взрослых растений в октябре–ноябре. Подробно режим стерилизации материала, состав питательных сред, условия культивирования и особенности размножения описаны ранее (Чурикова, 2016). Для укоренения побеги размером 2,0–2,5 см отделяли и помещали на питательную среду MS с половинным содержанием макросолей (Murasige, Skoog, 1962), с добавлением 20 г/л сахарозы, 1 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК) и 0,5 г/л активированного угля. Температура культивирования составляла 21–23° С, фотопериод 16 ч день/8 часов ночь. Фиксацию растительного материала проводили каждые 7 дней в течение четырех недель: для анатомических исследований – в фиксаторе Кларка (3 части 96 % этилового спирта: 1 часть ледяной уксусной кислоты), для анализа экспрессии – в RNA-later (Sigma, Япония).

Срезы базальной части микропобегов изготавливали вручную, окрашивали водным раствором метиленового синего. Полученные препараты анализировали при помощи светового микроскопа (Carl Zeiss, Германия). Выделение тотальной РНК из участков микропобегов проводили при помощи набора реагентов для выделения РНК RNeasy Plus Mini Kits (Qiagen, США) согласно инструкции производителя. Растирание образцов растительной ткани проводили вручную в лизирующем буфере из указанного набора реактивов. Для удаления остатков геномной ДНК полученные препараты РНК непосредственно перед синтезом кДНК обрабатывали DNase I (Thermo Fisher Scientific, USA) согласно инструкции производителя. Синтез кДНК проводили с использованием набора Reverta-L (ИнтерЛабСервис, Россия) в течение 30 минут при 37 °С.

Уникальные праймеры для оценки уровня экспрессии генов *PIN1* и *PIN2* подбирали с использованием гомологичных последовательностей мРНК *R. canina* [KF543362] и [KF543363] соответственно при помощи сервиса Primer-BLAST (Ye et al., 2012). Праймеры для гена *PP2A* (protein phosphatase 2A) синтезировали согласно работе (Klie, Debener, 2011).

Количественное содержание мРНК генов *PIN1* и *PIN2* с нормализацией относительно гена *PP2A* определяли путем ПЦР в реальном времени с использованием в качестве интеркалирующего красителя EvaGreen (Biotium, США), который добавляли в реакцию смесь, содержащую dNTP, ПЦР-буфер, MgCl₂ и Taq F-полимеразу с ингибирующими активностью фермента антителами (ИнтерЛабСервис, Россия) и праймеры, комплементарные участку мРНК целевого гена или гена *PP2A* (Евроген, Россия). В качестве матрицы использовали кДНК, получение которой описано выше. Температурный профиль реакции: 95 °С – 600 с.; 40 циклов: 95 °С – 10 с., 56 °С – 10 с., 72 °С – 10 с. Уровень флуоресценции регистрировался в конце каждого цикла с использованием автоматического анализатора LightCycler 96 Instrument (Roche, USA).

При сравнении регенерационной способности изученных сортов роз была отмечена различная их реакция на условия *in vitro*. Проведенный сравнительный анализ ризогенеза в эксплантах сортов ‘Nina Weibull’ и ‘Rosarium Uetersen’ из разных садовых групп показал, что укоренение их было возможно после 4–5 пассажа. Ранее было показано, что использование среды с ИУК, а не с ИМК (индолилмасляной кислотой) было предпочтительнее для всех сортов; спустя один месяц было отмечено формирование большего числа корней. Тогда как при использовании ИМК в базальной части эксплантов обоих сортов образовывался каллус 5–8 мм; у сорта ‘Nina Weibull’ формирование корней происходило в единичных эксплантах, а у сорта ‘Rosarium Uetersen’ при этом корнеобразования вообще не наблюдалось (Чурикова, 2016).

Так, спустя 1 месяц культивирования микропобегов сорта ‘Nina Weibull’ на среде для индукции ризогенеза (с добавлением ИУК) среднее количество формирующихся придаточных корней было $5,5 \pm 0,5$ при средней их длине $20 \pm 3,5$ мм. У сорта ‘Rosarium Uetersen’ (группа плетистые розы) эти же показатели были $2,72 \pm 0,4$ и $8,5 \pm 0,45$ мм соответственно.

Анатомический анализ базальной части микропобегов показал, что уже спустя 7 дней после начала культивирования микропобегов сорта ‘Nina Weibull’ на среде для укоренения с добавлением ИУК формируются 1–3 зачатка придаточных корней размером от 0,2 до 0,5 мм. На 14-й день культивирования микропобегов их число увеличивается до 2–4, а их длина находится в диапазоне 0,83–3,7 мм. У сорта ‘Rosarium Uetersen’ на срезах, сделанных через 7 дней никаких зон меристематической активности клеток не было обнаружено, а зачатки корней в числе 1–2 и длиной до 3,5 мм наблюдали на срезах базальной части микропобегов лишь спустя 14 дней.

При анализе экспрессии гена *PIN1* было показано наличие невысокого уровня транскрипта, сходного во всех изученных образцах обоих сортов. Тогда как продукт гена *PIN2* детектировался в ряде образцов сорта ‘Nina Weibull’. Особенно высокий уровень экспрессии этого гена был обнаружен в образце, в котором наблюдали одновременно заложение и развитие зачатков придаточных корней. Самый низкий уровень экспрессии был показан в базальных частях побегов без видимых анатомических изменений, связанных с процессами ризогенеза. В остальных образцах, где наблюдали заложение зачатков придаточных корней уровень экспрессии гена *PIN2* оказался несколько выше. Причем, у тех образцов, у которых рост придаточных корней уже был виден при внешнем осмотре эксплантов, экспрессии этого гена не наблюдали. В образцах, полученных из базальных частей микропобегов сорта ‘Rosarium Uetersen’, транскрипт гена *PIN2* практически отсутствовал.

Fett-Neto et al. (2011) наблюдали увеличение уровня экспрессии гена *PIN1* в базальной части черенков *Eucalyptus globulus* Labill. в первые 24 часа после обработки их ИМК. Небольшое количество транскриптов этого гена в изученных нами образцах скорее всего связано с тем, что *PIN1* регулирует транспорт ауксинов на ранних стадиях формирования придаточных корней.

Таким образом, сравнительный анализ процессов корнеобразования в микропобегах двух сортов роз из разных садовых групп показал, что сорт ‘Nina Weibull’ (группа флорибунда) отличается более ранним и интенсивным, по сравнению с другим сортом, заложением корней. При этом именно у этого сорта наблюдается увеличение уровня экспрессии гена *PIN2*, связанного с транспортом ауксинов, в период интенсивного роста примордиев придаточных корней. Экспрессия гена *PIN1* при этом практически не меняется. Проведенный анализ корнеобразования у сортовых роз подтверждает значительное влияние генотипа растения на успех размножения *in vitro*.

Благодарности. Работа выполнена в рамках гостемы НИР: АААА-А16-116021660105-3.

ЛИТЕРАТУРА

- Алехно Г. Д., Высоцкий В. А. Клональное микроразмножение роз // Филогения и биохимия культурных растений, 1986. – Т.18, №5. – С.489–493.
- Былов В. Н., Михайлов Н. Л., Сурина Е. И. Розы. Итоги интродукции. – М.: Наука, 1988. – 431 с.
- Чурикова О. А. Размножение некоторых сортов роз *in vitro* // Плодоводство и ягодоводство России, 2016. – Т. 47. – С. 359–363.
- Юдинцева Е. В. Культура корнесобственных роз // Опыт выращивания роз. – М., 1965. – С. 125–139.
- Da Costa C., De Almeida M., Ruedell C., Schwambach J., Maraschin F., Fett-Neto A. When stress and development go hand in hand: main hormonal controls of adventitious rooting in cuttings // Frontiers in Plant Science, 2013. – Vol. 4. – P. 133.
- Fett-Neto A., De Almeida M., Ruedell C. Expression of auxin carrier genes during adventitious rooting in *Eucalyptus globulus* // BMC Proceedings, 2011. – Vol. 5 (Suppl. 7) – P. 64.
- Jung S., Ficklin S., Lee T., Cheng C.-H., Blenda A., Zheng P., Yu J., Bombarely A., Cho I., Ru S., Evans K., Peace C., Abbott A. G., Mueller L. A., Olmstead M. A., Main D. The genome database for Rosaceae (GDR): year 10 update // Nucl. Acids Res., 2014. – Vol. 42, No. 1. – P. 1237–1244.
- Klie M., Debener T. Identification of superior reference genes for data normalization of expression studies via quantitative PCR in hybrid roses (*Rosa hybrida*) // BMC Res. Notes, 2011. – Vol. 28, No. 4. – P. 518.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. // Physiol. Plant., 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
- Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutache I., Rozen S., Madden T. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction // BMC Bioinformatics, 2012. – Vol. 13. – P. 134.