

УДК 582.998.2:58.085+635.9:631.53

## Формирование и сохранение коллекции видов и сортов хризантемы (*Chrysanthemum* L.) в культуре *in vitro*

### The formation and preservation of species and cultivars of daisy (*Chrysanthemum* L.) collection in culture *in vitro*

Пищева Г. Н.

Pishcheva G. N.

Научно-исследовательский институт садоводства Сибири им. М. А. Лисавенко, г. Барнаул. E-mail: pishcheva\_galina@mail.ru  
Federal State Budgetary Scientific Institution Lisavenko Research Institute of Horticulture of Siberia

**Реферат.** Усовершенствована технология клонального микроразмножения на основе регенерации растений из фрагментов соцветия и создана коллекция хризантемы (*Chrysanthemum* L.) *in vitro*, содержащая 35 сортов.

**Summary.** As a result, the technology of clonal micropropagation on the base of plant regeneration with inflorescence fragments was improved and the chrysanthemum (*Chrysanthemum* L.) collection *in vitro*, consisting of 35 cultivars, was made.

#### Введение

Хризантема относится к ведущим и популярным цветочным культурам. Однако в условиях Сибири многие сорта, особенно крупноцветковые, проявляют низкую зимостойкость. Создание и сохранение коллекции требуют отбора наиболее устойчивых сортов, выполнения определенных агротехнических мероприятий, в частности, в зимний период: укрытие растений, хранение маточника в теплице или выращивание *in vitro*.

Существует несколько способов создания генетических коллекций. Это сохранение образцов в полевых условиях, криосохранение в жидком азоте при  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  и медленно растущие коллекции *in vitro*. Первые 2 способа используются для создания постоянных и запасных коллекций (Дунаева). Такие коллекции имеют свои отрицательные стороны, которые компенсируются коллекциями *in vitro*, позволяющими быстро запустить процесс клонирования ценных генотипов (Гранда, 2009).

Технология клонального микроразмножения представляет исключительную ценность для поддержания и сохранения коллекций ботанических садов, и особенно в тех случаях, когда вид или сорт представлен ограниченным количеством экземпляров (Короткова, 2010).

Проведенные исследования Р. Гранда показали, что использование в качестве экспланта при клональном микроразмножении хризантем только верхнего яруса микрорастения возможно получать более качественный посадочный материал (Гранда, 2009). Оптимальной питательной средой на этапе размножения предложена среда Мурасиге и Скуга (МС) с добавлением 2,6 мкМ индолилуксусной кислоты (ИУК) или от 0,5 до 6 мкМ индолил-3-масляной кислоты (ИМК), 15 г/л сахарозы (Миронова, 2004; Гранда, 2009). Smaranda Vantu (2005) использовал для микроразмножения *Chrysanthemum morifolium* Ramat. питательную среду МС с 9 мкМ 6-бензиламинопурина (БАП) и 0,01 мкМ  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты (НУК). В наших опытах указанные среды приводили к сильному вытягиванию, истончению растений либо к витрификации эксплантов, что в дальнейшем отрицательно сказывалось на их развитии и стимулировало образование каллуса в базальной части побега.

Цель данной работы – создание коллекции *in vitro* хризантемы (*Chrysanthemum* L.) для климатических условий Западной Сибири.

#### Объекты и методы исследования

Коллекционный фонд Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательского института садоводства Сибири имени М. А. Лисавенко» (ФГБНУ «НИИСС»)

представлен 40 сортами рода *Chrysanthemum* L., принадлежащим 3 видам (*Chrysanthemum coreanum* L., *C. indicum* L., *C. hortorum*). В опытах по клональному микроразмножению использовано 32 сорта.

В работе применяли общепринятые методики (Бутенко, 1964; Калинин, 1980). Растительный материал отбирали с растений открытого грунта в первой декаде сентября. В качестве эксплантов при микроразмножении использовали фрагменты соцветия в фазе бутонизации (чашелистики, цветоножка, цветоложе, цветок с частью цветоложа). Питательные среды готовили по прописи МС с добавлением 30 г/л сахарозы. Из регуляторов роста использовали НУК 1,0 мкМ, ИМК 0,1 мкМ, БАП 0,25, 10, 15, 20 мкМ, тидиазурон (TDZ) 10, 15 мкМ, кинетин (Кн) 0,5 мкМ. При стерилизации бутонов применяли одноступенчатый (промывание 5 мин. с ПАВ под проточной водой + в условиях ламинар-бокса 0,1% раствор сулемы 10 мин) и двухступенчатый (промывание 5 мин. с ПАВ под проточной водой + в условиях ламинар-бокса 0,1% растворе сулемы 3 мин + сульфохлоронтин 10 мин) способы. Адаптировали растения к условиям *ex vitro* в лаборатории при освещенности 3 клк и фотопериоде 16/8 ч.

Статистическая обработка данных общепринятая (Доспехов, 1985). В таблице приведены средние арифметические величины и ошибка средней ( $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$ )

Таблица

Укоренение микрорастений хризантемы на среде МС + Кн 0,5 мкМ + ИМК 0,25 мкМ, n = 10

Показатель	Сорт		
	'Урсула Фэнси'	'Elen'	'Клеопатра'
Высота растения, мм	18,6 ± 1,9	16,8 ± 1,4	15,3 ± 2,4
Количество корней, шт.	2,9 ± 0,6	13,7 ± 2,1	7,2 ± 1,5
Длина корней, мм	16,6 ± 1,6	8,2 ± 1,0	8,0 ± 0,8
Количество листьев, шт.	3,9 ± 0,3	4,1 ± 0,5	5,5 ± 0,8

### Результаты и обсуждение

Одноступенчатая стерилизация позволила получить 14,3–60,0 % (*Chrysanthemum* 'Okishor'), 28,6–90,0 % (*Chrysanthemum* 'Опал') и 73,3–80,0 % (*Chrysanthemum* 'Elen') стерильных эксплантов соцветия. При двухступенчатой стерилизации получили до 70 % стерильных и 100 % жизнеспособных эксплантов *Chrysanthemum* 'Okishor'. У *Chrysanthemum* 'Elen' показатель стерильности достиг 90 % с жизнеспособностью 96,7 %. Гибель инфицированных эксплантов наступала в течение 30 дней. При стерилизации растительного материала до 2014 г. вместо промывания эксплантов с поверхностно-активным веществом (ПАВ) под проточной водой использовали промывание в условиях ламинар-бокса стерильной дистиллированной водой. Применение «Доместоса» в качестве ПАВ позволило повысить процент стерильности до 86,7 % при 100 %-ной жизнеспособности (*Chrysanthemum* 'Опал').

На этапе введения в культуру *in vitro* оптимальной считается питательная среда, способствующая получению морфологически правильно сформированных побегов, а также поддерживающая рост и размножение эксплантов.

Прямую регенерацию у хризантемы наблюдали на эксплантах цветков с частью цветоложа. В других вариантах (чашелистики, цветоножка, цветоложе) регенерации побегов не было. К 20–30-м дню культивирования микропобеги имели длину 10–15 мм. В дальнейшем регенеранты лучше развивались на питательной среде, обогащенной 10 и 20 мкМ БАП, 1,0 мкМ НУК и 0,1 мкМ ИМК. На среде с TDZ побеги развивались генеративными, замедляли рост, в некоторых случаях проявлялась витрификация, листья приобретали желтый оттенок. Максимальное количество побегов, морфологически правильно сформированных, из одного соцветия получено у *Chrysanthemum* 'Анна', 'Урсула Фэнси' и 'Elen' (15 шт.). Среднее количество регенерантов на один бутон составило 7 шт.

Полученные на этапе введения в культуру *in vitro* побеги высаживали на питательные среды, содержащие различные концентрации фитогормонов БАП, Кн, ИМК, НУК, и безгормональные. На среде, дополненной ИМК 3мкМ, были получены длинные побеги с высоким коэффициентом размножения, но, несмотря на эти положительные результаты, такая композиция приводила к сильному вытя-

гиванию побегов и истончению стебля культивара, что негативно сказывалось на последующем росте побега.

Наилучшие результаты роста и развития микрорастений хризантемы на этапе собственно микроразмножения выявлены на питательных средах с содержанием Кн 0,5-1,5 мкМ и ИМК 0,25 мкМ.

Было установлено, что на этапе собственно микроразмножения побеги хризантемы активно формируют корневую систему (табл.). Эта особенность позволяет исключить этап укоренения из технологии клонального микроразмножения и ускорить процесс.

Достоверной разницы между сортами не выявлено.

Количество укоренившихся растений на рекомендуемых питательных средах составило 70–100 %, но с увеличением концентрации Кн до 3 мкМ показатель снижается до 20–50 %. Причина, по всей видимости, в том, что цитокинины являются антагонистами для гормонов ауксинового ряда. Отобраные растения были перенесены в условия *ex vitro*, минуя этап укоренения.

Для адаптации к нестерильным условиям растения высаживали в пластмассовые стаканы объемом 200 мл, заполненные стерильным субстратом (песок с вермикулитом и перлитом в отношении 2:1:1 и песок с измельченным кокосовым волокном (4:1)). Для создания условий повышенной влажности в течение 7 дней накрывали сверху стаканчиками, поливали и опрыскивали, не допуская пересыхания субстрата. Число адаптированных растений к нестерильным условиям составило 100 %.

Благодаря сформировавшейся корневой системе культивары способны расти без пересадки 3–4 месяца на питательной среде Кн 0,5 мкМ + ИМК 0,25 мкМ, при этом на побегах отсутствуют пожелтевшие листья. Отмирание листовых пластинок и в последующем апекса побегов отмечалось на пятый месяц культивирования.

На сегодняшний день в коллекции *in vitro* ФГБНУ «НИИСС» сохранены хризантемы 32 генотипов: 19 сортов – *C. hortorum*, 11 – *C. coreanum* L. и 2 – *C. indicum* L.

Результаты проведенных исследований по клональному микроразмножению хризантемы садовой позволили рекомендовать в качестве экспланта цветок с частью цветоноса; на этапе собственно микроразмножения – питательные среды с содержанием Кн 0,5–1,5 мкМ и ИМК 0,25 мкМ. При адаптации микрорастений к условиям *ex vitro* рекомендуется использование стерильных субстратов из песка, вермикулита и перлита в соотношении 3:1:1 или песка и измельченного кокосового волокна (4:1). Сортоспецифичность при микроразмножении *in vitro* хризантемы не выявлена.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
- Гранда Х. Идентификация В вируса хризантем и создание коллекции *in vitro* оздоровленного посадочного материала: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2009. – 19 с.
- Доспехов Б. Н. Методика полевого исследования (с основами статистической обработки результатов исследований). – М.: Агрпромпиздат, 1985. – 351 с.
- Дунаева С. Е., Гавриленко Т. А. Коллекции плодовых и ягодных культур *in vitro* (стратегия создания и хранения). – 9 с. // ВИР. Официальный сайт. – URL: <http://www.vir.nw.ru/biot/pdf/d&g.pdf>
- Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наукова думка, 1980. – 488 с.
- Короткова О. О., Короткова О. И. Сохранение коллекции клематисов (*Clematis* L.) ГУ «Волгоградский региональный ботанический сад» в культуре *in vitro* // Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира: Сб. статей по материалам III Всероссийской научно-практ. конф. (4–6 августа 2010 г., Волгоград). – Волгоград: AVATARS, 2010. – С. 145–153.
- Миронова О. Ю. Разработка и совершенствование технологий клонального микроразмножения декоративно-цветочных культур: Дис. ... канд. биол. наук. – М., 2004. – 141 с.
- Smaranda Vantu *In vitro* multiplication of chrysanthemum morifolium Ramat // Analele stintifice ale Universitatii "Al.I. Cuza" Iasi Tomul LI, s. II a. – Biologie vegetala, 2005. – P. 75–79.