В. И. Маляровская, зав. лабораторией биотехнологии, физиологии и биохимии растений, к. б. н.,
Л. С. Самарина, к. б. н., снс,
Н. Г. Конинская, мнс
ФГБНУ ВНИИЦиСК, г. Сочи
malyarovskaya@yandex.ru

УДК 634.3:635.9:578.083

DOI 10.31676/2073-4948-2018-54-97-105

СОЗДАНИЕ И ПОДДЕРЖАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ ХРИЗАНТЕМЫ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Резюме. Состав коллекции асептической культуры хризантемы *in vitro* ВНИИЦиСК представлен более чем 40 промышленными сортами. Показано, что оптимальной для хранения *in vitro* и укоренения большинства сортов является питательная среда $\frac{1}{4}$ МС без добавления регуляторов роста. На этой питательной среде растения можно хранить без пересадок до 6 месяцев при температуре +10 °С и интенсивности освещения 20 люкс. На этой же питательной среде при стандартных условиях температуры и освещения (+20 °С и 3000 люкс) необходима пересадка растений каждые 2-3 месяца. При добавлении маннита в питательную среду (100 и 200 ммоль) отмечено снижение прироста микропобегов в 2 и в 5 раз соответственно по сравнению с контролем. Относительное содержание воды в листьях существенно снижалось при добавлении маннита в питательную среду. Содержание пролина в листьях микропобегов составило 3,42 и 4,65 мг/г (100 и 200 ммоль маннита, соответственно), что в 6-8 раз выше, чем в контроле. Полученные результаты позволили усовершенствовать методики культивирования хризантемы *in vitro*.

Ключевые слова: Chrysanthemum, коллекция *in vitro*, генофонд, микроразмножение, цветководство, осмотические регуляторы.

Summary. The collection contains more than 40 commercial varieties. It is shown that the optimal medium for *in vitro* storage and rooting of most varieties is the nutrient medium $\frac{1}{4}$ MS without the addition of growth regulators. The chrysanthemum microplants can be conserved on this culture media without subculturing up to 6 months under the temperature of +10 °C and light intensity of 20 lux. The period between passages is 2-3 months when plants are maintained under normal conditions (t + 20 °C and light of 3000 lux) using the same culture media. Addition of mannitol to the nutrient medium (100 and 200 mmol), inhibited shoot growth 2 and 5-times, respectively, compared with the control. The relative water content in the leaves was significantly reduced under effect of mannitol in the nutrient medium. The proline content in the leaves was 3.42 and 4.65 mg / g (100 and 200 mmol of mannitol, respectively), which is 6-8 times higher than in the control. The obtained results allowed to improve the methods of cultivation of chrysanthemum *in vitro*.

Keywords: Chrysanthemum, collection *in vitro*, plant genetic resources, micropropagation, floriculture, osmolytes.

Введение

Одним из основных и важных направлений исследований во Всероссийском научно-исследовательском институте цветоводства и субтропических культур является мобилизация мировых ресурсов культурных растений и их диких сородичей, создание, пополнение и поддержание генетических коллекций, изучение, идентификация генофонда, интродукция и выделение в промышленный сортимент цветочно-декоративных и субтропических плодовых культур [1, 2].

Как правило, коллекции субтропических плодовых и цветочно-декоративных культур поддерживаются в полевых условиях [3, 4], что сопряжено с определенным риском потери ценных генотипов в результате неблагоприятных условий окружающей среды (биотические и абиотические стрессы). Известно, что метод культуры тканей позволяет сохранить генофонд, создать генобанк и быстро размножить новые селекционные сорта и формы, а также оздоровить посадочный материал от комплекса патогенов [5].

Хризантема – популярная срезочная культура, которая занимает второе место после роз по экономическим показателям в десятке промышленных срезочных культур. В связи с чем целью данной работы является сохранение коллекции и установление влияния осморегулятора маннита на рост и развитие хризантемы *in vitro*.

Материалы и методы

Изучали влияние маннита (вариант 1 – 100 ммоль, вариант 2 – 200 ммоль) в питательной среде на рост и физиологические параметры растений при стандартных условиях освещения 3000 люкс, режим 16/8 и температуре +22 ±2 °С. Базовая среда МС [6] с добавлением сахарозы 25 г/л, фитагеля 2,5 г/л. Контролем служили растения на питательной среде без добавления маннита. Анализ содержания пролина проводили нингидриновым методом [7]. Относительное содержание воды (ОСВ) рассчитывали по формуле:

$$ОСВ(\%) = \frac{(\text{свежий вес} - \text{сухой вес}) \times 100}{\text{свежий вес}}$$

В каждом варианте минимум 27 растений в трех повторностях. Данные анализировали методом однофакторного дисперсионного анализа, различия между вариантами сравнивали с контролем и значимость различий оценивали по стандартным отклонениям от среднего.

Результаты и обсуждение

За последние годы коллекция *in vitro* пополнилась сортами из АО «Галантус» (г. Калуга), ЗАО «Московский» (г. Москва), Калининградского

производственного хозяйства (г. Калининград), Ставропольского производственного хозяйства (г. Ставрополь), ботанических садов – Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина (г. Москва), Никитского ботанического сада – Национального научного центра РАН (г. Ялта), Центрального ботанического сада НАН Беларуси (г. Минск), а также от садоводов-любителей. Коллекция хризантемы *in vitro* представлена более чем 40 сортами (табл.). Среди них сорта отечественной и зарубежной селекции, различного срока цветения, крупноцветковые и мелкоцветковые, горшечные и на срез. Все эти сорта являются востребованными в производстве и используются для создания маточных насаждений. В 2017 году коллекция была пополнена 11 новыми сортами, планируется их размножение и внедрение в производство.

Таблица.

Сорта хризантемы садовой в коллекции *in vitro* ВНИИЦиСК

№ пп	Сорт	Источник получения	Назначение сорта
1	Tiger	Россия, г. Сочи, ФГБНУ ВНИИЦиСК	Срез
2	Baltika white	Россия, г. Калининград, питомник «Каменково»	Срез
3	Dodu	Россия, г. Москва «Агрокомбинат Московский»	Горшечная
4	Gazo	Россия, г. Москва «Агрокомбинат Московский»	Горшечная
5	Soda Vanile	Россия, г. Москва «Агрокомбинат Московский»	Горшечная
6	Yoder white	Россия, г. Москва «Агрокомбинат Московский»	Горшечная
7	Spider pink	Россия, г. Калининград, питомник «Каменково»	Срез
8	Westland pink	Россия, г. Сочи, ФГБНУ ВНИИЦиСК	Срез
9	Yaguar purple	Россия, г. Калининград, питомник «Каменково»	Срез
10	Yahou Golden Jellow	Россия, г. Москва «Агрокомбинат Московский»	Срез
11	Zembla gold	Россия, г. Сочи, ФГБНУ ВНИИЦиСК	Срез
12	Anastasia yellow	Россия, Ставропольский край ООО «Альфа»	Срез
13	Balloon	Россия, г. Сочи, ФГБНУ ВНИИЦиСК	Срез
14	Vesuvius	Россия, г. Сочи, ФГБНУ ВНИИЦиСК	Срез
15	Grand pink	Россия, Ставропольский край ООО «Альфа»	Срез
16	Grenada	Россия, г. Сочи, ФГБНУ ВНИИЦиСК	Срез
17	Zembla white	Россия, Ставропольский край ООО «Альфа»	Срез
18	Золотая Нива	Россия, г. Сочи, ФГБНУ ВНИИЦиСК	Срез
19	Izetka Bernshteyna	Россия, г. Сочи, ФГБНУ ВНИИЦиСК	Срез
20	Камея	Россия, г. Сочи, ФГБНУ ВНИИЦиСК	Срез

Продолжение табл.

№ пп	Сорт	Источник получения	Назначение сорта
21	Linda crème	Россия, Ставропольский край ООО «Альфа»	Срез
22	Mona Lisa pink	Россия, г. Сочи, ФГБНУ ВНИИЦиСК	Срез
23	Mona Lisa white	Россия, Ставропольский край ООО «Альфа»	Срез
24	Ноктюрн	Россия, г. Сочи, ФГБНУ ВНИИЦиСК	Срез
25	Rebonet	Россия, Ставропольский край ООО «Альфа»	Срез
26	Resome pink	Россия, Ставропольский край ООО «Альфа»	Срез
27	Севан	Россия, г. Сочи, ФГБНУ ВНИИЦиСК	Срез
28	Солнечная	Россия, г. Сочи, ФГБНУ ВНИИЦиСК	Срез
29	Тегерек	Россия, г. Сочи, ФГБНУ ВНИИЦиСК	Срез
30	Tokyo	Россия, г. Сочи, ФГБНУ ВНИИЦиСК	Срез
31	Focus	Россия, г. Сочи, ФГБНУ ВНИИЦиСК	Срез
32	Саратов	Россия, г. Москва, ГБС им. Н.В. Цицина	Срез
33	Stresa	Россия, г. Москва, ГБС им. Н.В. Цицина	Срез
34	Pip	Россия, г. Москва, ГБС им. Н.В. Цицина	Срез
35	Dante	Россия, г. Москва, ГБС им. Н.В. Цицина	Срез
36	Fuedo Dark	Россия, г. Москва, ГБС им. Н.В. Цицина	Срез
37	Saphina	Россия, г. Москва, ГБС им. Н.В. Цицина	Срез
38	Princess Ann	Россия, г. Москва, ГБС им. Н.В. Цицина	Срез
39	Умка	Россия, г. Москва, ГБС им. Н.В. Цицина	Срез
40	Ветчизна	Россия, г. Москва, ГБС им. Н.В. Цицина	Срез

В результате исследований по оптимизации питательных сред и условий депонирования хризантемы было выявлено, что питательная среда $\frac{1}{4}$ МС без добавления регуляторов роста является оптимальной для хранения *in vitro* и укоренения большинства сортов. На этой питательной среде продолжительность культивирования микрорастений хризантемы без пересадок при температуре +10 °С и интенсивности освещения 300 люкс достигает 8-10 месяцев (рис. 1 а).

Однако при стандартных условиях температуры и освещения (+20 °С и 3000 люкс) продолжительность культивирования сокращается до 2-3 месяцев. Для микроразмножения посадочного материала хризантемы оптимальной питательной средой является $\frac{1}{2}$ МС с добавлением НУК в концентрации 0,5 мг/л. При этом коэффициент размножения составляет 5-7 микрочеренков с одного микрорастения за месяц.

В результате визуальных наблюдений было отмечено, что у некоторых сортов при длительном культивировании на данной питательной среде

происходит нарушение морфогенеза, которое проявляется в усиленном корнеобразовании взамен роста побегов (‘Izetka Bernshteyna’, ‘Zembla white’, ‘Rebonet’ и др.) (рис. 1 б).

Рис. 1. а: хризантема в условиях депонирования при $t +10\text{ }^{\circ}\text{C}$ и интенсивности освещения 300 люкс; б: нарушение морфогенеза при многолетнем непрерывном размножении *in vitro* на среде с НУК (0,5 мг/л) (слева – нормальное развитие, справа – микрорастения с укороченными побегами).

По всей видимости, это связано с накоплением ауксинов в тканях эксплантов, и для нивелирования этого негативного эффекта необходимо проводить несколько пассажей на обедненной питательной среде без содержания регуляторов роста.

Разработка режимов продолжительного культивирования растений в условиях *in vitro* без многократных пересадок является важнейшим этапом решения вопроса их длительного сохранения. Известно, что хранение в условиях замедленного роста позволяет поддерживать биологический материал от нескольких месяцев до 2–3 лет без субкультивирования, в зависимости от используемой технологии и вида растения [8].

Добавление в питательную среду осмотически активного вещества – маннита – позволяет замедлить рост растений и часто используется как альтернативный источник углеводов, способствуя увеличению периода между пересадками растений, что позволяет сократить трудовые затраты при сохранении коллекции *in vitro*. В результате изучения индукции осмотического стресса при добавлении 100 и 200 ммоль маннита, было установлено, что в обоих вариантах опыта растения сохраняли жизнеспособность на

протяжении 90 дней. Однако между вариантами отмечались различия по ростовым параметрам. Прирост микропобегов снижался в 2 раза между вариантами и в 5 раз по сравнению с контролем (100 и 200 ммоль маннита соответственно) (рис. 2).

Рис. 2. Влияние маннита на ростовые параметры хризантемы 'Vesuvius' через две недели культивирования.

Развитие корневой системы существенно ингибировалось во втором варианте (200 ммоль маннита). Среднее количество корней/эксплант составляло 4-5 шт. (контроль) и 0-3 шт. (варианты). Ингибирование длины корней происходило пропорционально концентрации маннита. Длина корней была в 4 раза меньше в сравнении с контролем (вариант 1), а в варианте 2 длина корневой системы составила 0,2 см по сравнению с контролем (3,0 см). Относительное содержание воды в листьях существенно снижалось пропорционально концентрации маннита в питательной среде, что свидетельствует о водном дефиците в тканях (рис. 3).

При этом данный показатель в вариантах составил 89% и 86% соответственно, что на 4-6 % ниже, чем в контроле. Аналогичные данные были получены другими исследователями, которые показывали снижение относительного содержания воды в листьях различных видов растений [9]. В то же время содержание пролина в листьях микропобегов существенно возрастало, что является индикацией осмотического стресса (рис. 4).

Рис. 3. Влияние маннита на относительное содержание воды в листьях (%) хризантемы «Vesuvius» через две недели культивирования.

Рис. 4. Влияние маннита на содержание пролина (мкг/г) в листьях хризантемы садовой "Vesuvius" через две недели культивирования.

Оно составило 3,42 и 4,65 мг/г сырого вещества в вариантах 1 и 2 соответственно, что в 6-8 раз выше, чем в контроле. Другими авторами было также подтверждено, что пролин не только является индикатором осмотического стресса, но и наряду с другими осмолитами выполняет важную роль в стабилизации водного обмена [10]. Было также показано, что стабилизация водного обмена может быть достигнута растением либо снижением транспирации, уменьшением размера растения, или снижением фотосинтеза, что подтвердилось в наших экспериментах на хризантеме.

Заключение

Таким образом, нами установлено, что при добавлении маннита в концентрации 100 и 200 ммоль/л в питательную среду отмечалось повышение содержания пролина в листьях микропобегов, снижение относительного содержания воды в листьях, снижение ростовой активности и ингибирование корнеобразования. Также в процессе исследований показано, что совместное использование оптимальных показателей интенсивности освещения, состава питательной среды, концентрации осмотиков может значительно увеличить как период субкультивирования эксплантов в процессе хранения *in vitro*. В заключение необходимо отметить, что создание и пополнение коллекции асептической культуры хризантемы *in vitro* создает предпосылки как для проведения научных исследований, так и для производственного размножения перспективных сортов и создания маточного питомника.

Список использованной литературы

1. Коломиец Т. М., Маляровская В. И., Гвасалия М. В., Самарина Л. С., Соколов Р. Н. Микроразмножение *in vitro* субтропических, декоративных культур и эндемиков Западного Кавказа: оригинальные и оптимизированные протоколы // Сельскохозяйственная биология, 2014. – №3. – С. 49-58.
2. Рындин А. В., Мохно В. С. Генетические ресурсы садовых растений в субтропиках России и возможности их использования // Субтропическое и декоративное садоводство, 2012. – Т. 47. – № 2. – С. 13-22.
3. Слепченко Н. А., Клемешова К. В., Келина А. В. Коллекции цветочно-декоративных культур во Всероссийском научно-исследовательском институте цветоводства и субтропических культур // Цветоводство: История, Теория, Практика: Матер. VII межд. научной конференции. – Мн: Центральный ботанический сад НАН Беларуси, 2016. – С. 197-199.
4. Тыщенко Е. Л., Мохно В. С., Братухина Е. В., Коломиец Т. М., Арутюнова Е. С., Евсюкова Т. В. и др. Селекция цветочно-декоративных культур // Программа селекционных работ по плодовым, ягодным, цветочно-декоративным культурам и винограду союза селекционеров северного Кавказа на период до 2010 г. – Краснодар: РАСХН, 2005. – С. 309-327.

5. Коломиец Т. М., Маляровская В. И., Губаз С. Л. Создание и поддержание коллекции субтропических плодовых, цветочно-декоративных культур, редких и исчезающих видов растений Западного Кавказа в культуре *in vitro* // Плодоводство и ягодоводство России, 2015. – Т. 43. – С. 99-103.
6. Murashige T., Skoog F. A. Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures // *Physiologia Plantarum*, 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
7. Шивалеева Г. Н., Будняк А. К., Шивалеев И. И., Иващенко О. Л. Модифицированный метод определения пролина в растениях // Журнал Харьковского Национального Университета. Серия: Биология, 2014. - Вып. 21. - № 1112. - С. 168-172.
8. Cruz-Cruz C. A., González-Arno M. T., Engelmann F. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity // *Resources*, 2013. – Vol. 2. – P. 73–95.
9. Watanabe S., Katsumi K., Yuji I., Sasaki S. Effects of saline and osmotic stress on proline and sugar accumulation in *Populus euphratica* *in vitro* // *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 2001. – № 63. – P. 199–206.
10. Molinari H. B. C., Marur C. J., Daros E., de Campos M .K. F., de Carvalho J. F. R. P., Filho J. C. B. et al. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress // *Physiol Plant*, 2007. – № 130. – P. 218–229.

V. I. Malyarovskaya, L. S. Samarina, N. G. Koninskaya

Federal Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops, Sochi

CREATION AND MAINTENANCE OF CHRYSANTHEMUM COLLECTION IN VITRO