

УДК 504.73:57.085.2

DOI: 10.36305/0513-1634-2021-138-92-100

ОЗДОРОВЛЕНИЕ И РАЗМНОЖЕНИЕ *IN VITRO* ПЕРСПЕКТИВНЫХ СОРТОВ И ГИБРИДНЫХ ФОРМ ХРИЗАНТЕМЫ САДОВОЙ СЕЛЕКЦИИ НИКИТСКОГО БОТАНИЧЕСКОГО САДА

Ирина Вячеславовна Митрофанова, Ольга Владимировна Митрофанова,
Нина Павловна Лесникова-Седошенко, Наталия Владимировна Смыкова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН»,
Республика Крым, г. Ялта, пгт Никита, Никитский спуск, 52
E-mail: invitro_plant@mail.ru

Разработан протокол микроразмножения в условиях *in vitro* для сортов хризантемы садовой Мокрое Серебро, Предрасветный Аю-Даг, Эльдorado и Эрмитаж селекции НБС. 10-20 мг/л рибавирина обеспечивало оздоровление первичных эксплантов. Высокая частота регенерации адвентивных почек и микропобегов отмечена у сортов Эльдorado и Эрмитаж (21,0 и 23,5 микропобегов/эксплант) при культивировании на среде МС с 0,75 мг/л кинетина и сорта Мокрое Серебро на среде МС с 0,75 мг/л БАП (24,5 микропобегов/эксплант). Спонтанное корнеобразование обеспечило 100% укореняемость микропобегов.

Ключевые слова: *Chrysanthemum × morifolium*; эксплант; рибавирин; регенерация *in vitro*

Введение

Хризантема садовая (*Chrysanthemum × morifolium* Ramat.) – растения с различной формой и окраской цветков из семейства Asteraceae. Хризантемы занимают одно из важных мест на мировых цветочных рынках. Популярность хризантемы в России объясняется ярким и продолжительным осенним цветением, когда ассортимент других цветущих культур ограничен. В промышленном цветоводстве ее выращивают на срез и как горшечную культуру [5, 7, 8].

Коллекция хризантемы садовой Никитского ботанического сада формировалась с первых лет его становления (1812 г.) и насчитывает около 400 сортов и гибридных форм [6]. В настоящее время это крупная и наиболее полная коллекция в России, включающая все классы культуры, сорта азиатской, европейской, американской селекции, а также сорта и гибридные формы селекции Никитского ботанического сада – Национального научного центра (НБС-ННЦ). Известно, что при ежегодном вегетативном размножении посредством черенкования в растениях хризантемы могут накапливаться вирусные патогены, снижающие коэффициент размножения и ухудшающие качество посадочного материала [3, 18]. В связи с этим возникла необходимость поиска и разработки приемов оздоровления и эффективных протоколов микроразмножения *in vitro* исследуемых сортов.

Целью данной работы была разработка биотехнологических приемов оздоровления и размножения *in vitro* 4 крупноцветковых сортов и 2 гибридных форм хризантемы садовой коллекции НБС-ННЦ.

Объекты и методы исследования

Объектом для исследований служили 4 сорта ('Мокрое Серебро', 'Предрассветный Аю-Даг', 'Эльдорадо', 'Эрмитаж') и 2 гибридные формы ('№ 10-16' и '№ 15-17') хризантемы садовой (*Chrysanthemum* × *morifolium* Ramat.) селекции НБС-ННЦ (рис. 1):

'Мокрое Серебро'. Растения 40-50 см высотой; цветоносные побеги прочные, густо облиственные; листья зеленые, средние по размеру. Соцветия кремово-розовые, отогнутые, густомахровые, 13-14 см в диаметре.

'Предрассветный Аю-Даг'. Растения 90-100 см высотой; цветоносные побеги прочные, средне-облиственные; листья зеленые, средние по размеру. Соцветия кремово-розовые, полушаровидные, махровые, 14-15,5 см в диаметре.

'Эльдорадо'. Растения 90,0-100,0 см высотой; цветоносные побеги прочные, средне-облиственные; листья темно-зеленые, средние по размеру. Соцветия лиловые, плоско-полушаровидные, густомахровые, 15-17 см в диаметре.

'Эрмитаж'. Растения 110-130 см высотой; цветоносные побеги средне-прочные, средне-облиственные; листья темно-зеленые, средние по размеру. Соцветия кремово-белые, паукovidные, 18-22 см в диаметре.

'Гибридная форма № 10-16'. Растения 90-110 см высотой; цветоносные побеги средне-прочные, хорошо облиственные; листья зеленые, средние по размеру. Соцветия желтые, паукovidные, махровые и полумахровые, 16-20 см в диаметре.

'Гибридная форма № 15-17'. Растения 100–110 см высотой; цветоносные побеги средне-прочные, хорошо облиственные; листья темно-зеленые, крупные. Соцветия розовато-белые, кудряво-отогнутые, махровые и полумахровые, 17–19 см в диаметре.



Рис. 1 Цветение изучаемых сортов хризантемы: А - 'Мокрое Серебро'; Б - 'Предрассветный Аю-Даг'; В - 'Эльдорадо'; Г - 'Эрмитаж'; Д - гибридная форма № 10-16; Е - гибридная форма № 15-17

Изучаемые генотипы среднего срока цветения, за исключением гибридной формы № 10-16 (поздний срок цветения).

В опыт был включен растительный материал, отобранный с растений, предварительно протестированных на вирусы. Тестирование и ретестирование растений на вирусы осуществляли в соответствии с принятыми протоколами серологических (ИФА) и молекулярных (ПЦР) исследований [3].

Исследования по введению, оздоровлению и микроразмножению эксплантов 4 сортов и 2 гибридных форм хризантемы садовой в условиях *in vitro* выполнялись в

лаборатории биотехнологии и вирусологии растений НБС-ННЦ с использованием биотехнологических и вирусологических методов [1, 3, 13].

Верхушки и сегменты побегов с пазушными почками (1,5-2,0 см) последовательно стерилизовали растворами антисептиков: 50-70% раствором этанола (Россия), 1% раствором Thimerosal (Sigma, США) и 0,2-0,5% раствором ДезТаб (Китай) в разных концентрациях и экспозициях. В каждый раствор добавляли 2-3 капли детергента Tween 20 (Sigma, США). После каждого реагента экспланты 3-4 раза промывали стерильной дистиллированной водой. Апикальные меристемы размером 0,25-0,3 мм вычленили из почек под бинокулярным микроскопом SMZ745T (Nikon, Япония). Затем первичные экспланты – меристемы и сегменты побегов с узлом (1,0 см) помещали в культуральные сосуды на питательные среды. Все эксперименты работы по культуре органов и тканей *in vitro* выполняли в стерильных условиях бокса биологической безопасности SC2 (ESCO, Сингапур). Для изучения процессов морфогенеза и микроразмножения эксплантов в качестве базовой использовали питательную среду Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962) [15]. В зависимости от поставленной задачи питательные среды дополняли 0,5-2,0 мг/л 6-БАП (6-бензиламинопурин, Duchefa Biochemie, Голландия), 0,5-2,0 мг/л кинетина (6-фурфуриламинопурин, Panreac, Испания), 2,5 мг/л аденин сульфата (6-аминопурин, Panreac, Испания), 0,1-0,5 мг/л НУК (α -нафтилуксусная кислота, Duchefa Biochemie, Голландия) в различных концентрациях и сочетаниях. Каждая среда содержала 20,0 г/л сахарозы и 9,0 г/л агара (Panreac, Испания). Контролем служила питательная среда без регуляторов роста. pH – 5,6-5,7. Все среды автоклавировали в стерилизаторе LAC 5060S (DAIHAN LABTECH, Южная Корея) при 1 атм, 120°C в течение 8-12 минут. Растворы регуляторов роста и витаминов стерилизовали через фильтры MILLEX®GP (0,22 μ m) и добавляли в среды после автоклавирования. Для оздоровления от вирусной инфекции меристем, вегетативных почек и сегментов побегов с узлом применяли хемотерапию *in vitro*. В питательные среды при введении и первом субкультивировании вводили вироцид рибавирин (Virazole, 1- β -D-Рибофуранозил-1Н-1,2,4-триазол-3-карбоксамид, Sigma, США) в концентрации 5,0-40,0 мг/л [4]. Контроль – экспланты без обработки рибавирином. Одновременно оценивали влияние вироцида и его концентраций на морфогенез исследуемых генотипов. Субкультивирование проводили каждые 2-3 недели. Культуральные сосуды с эксплантами содержали в фитокапсуле при $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 16-ч фотопериоде и интенсивности освещения $37,5 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$ холодным белым светом флуоресцентных ламп (Philips TL, Япония). Часть эксплантов культивировали в камере моделирования климатических условий для роста растений MLR-352-PE (Panasonic, Япония). Полученные *in vitro* регенеранты хризантемы высаживали на адаптацию в вазоны объемом 0,25 л со смесью торфа (pH 5,0-5,6) и перлита в соотношении 2:1, помещали в климатические камеры MLR-352H-PE (Panasonic, Япония) и PGR 15 (Conviron, Канада), а затем переносили в теплицу.

Эксперименты проводили трижды в 20-кратной повторности. Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием программы STATISTICA for Windows 10.0 (StatSoft, Inc.) и многогранового теста Дункана ($p \leq 0.05$).

Результаты и обсуждение

Первым этапом введения первичных эксплантов в культуру *in vitro* является стерилизация. В процессе выполнения исследований разработаны способы стерилизации эксплантов хризантемы садовой. Показано, что более эффективной была последовательная ступенчатая стерилизация эксплантов растворами антисептиков (табл. 1).

Таблица 1

Оптимальные способы стерилизации растительного материала хризантемы садовой

Способ стерилизации		Количество эксплантов, свободных от контаминации, %	Жизнеспособность эксплантов, %
стерилизующее вещество и его концентрация	экспозиция, мин		
1	2	3	4
50% C ₂ H ₅ OH	1	54,4 de*	48,3 f
1% Thimerosal	7		
0,2 % p-p Дез ТАБ	7		
70% C ₂ H ₅ OH	1	62,8 bc	59,4 de
1% Thimerosal	5		
0,2% p-p Дез ТАБ	5		
70% C ₂ H ₅ OH	1	69,5 ab	70,2 ab
1% Thimerosal	7		
0,2% p-p Дез ТАБ	7		
50% C ₂ H ₅ OH	1	72,0 ab	64,9 bc
1% Thimerosal	7		
0,4% p-p Дез ТАБ	7		
70% C ₂ H ₅ OH	1	72,4 ab	70,8 ab
1% Thimerosal	5		
0,4% p-p Дез ТАБ	5		
70% C ₂ H ₅ OH	1	91,6 a	95,2 a
1% Thimerosal	7		
0,4% p-p Дез ТАБ	7		
70% C ₂ H ₅ OH	1	95,0 a	60,7 bc
1% Thimerosal	7		
0,5% p-p Дез ТАБ	10		

*Среднее значение, обозначенное одной и той же буквой в столбцах, достоверно не отличается при уровне значимости $P < 0,05$ при использовании критерия многогранного теста Дункана.

Оптимальным способом стерилизации первичных эксплантов 4 сортов и 2 гибридных форм хризантемы садовой (апикальных частей побегов и сегментов с узлами) была последовательная стерилизация в 70% этаноле (1 мин), 1% растворе Thimerosal (7 мин) и 0,4% растворе ДезТаб (7 мин). При этом уровень контаминации составил 5-25%. Увеличение концентрации ДезТаб и экспозиции обработки приводило к снижению уровня контаминации, но при этом увеличивалось количество нежизнеспособных эксплантов.

В Никитском ботаническом саду поддерживается крупная и наиболее полная в России коллекция сортов и гибридных форм хризантемы садовой. В мире на этой культуре описано свыше двадцати различных вирусов [2, 14, 17]. Поэтому для исследований экспериментальный материал был отобран с внешне бессимптомных растений.

Анализ результатов, полученных нами, продемонстрировал эффективность совместного применения методов хемотерапии *in vitro* и культуры органов и тканей для оздоровления изучаемых генотипов. На этапе введения первичных эксплантов и после первого субкультивирования для элиминации вирусной инфекции в среды добавляли рибавирин в концентрации 5,0-40,0 мг/л. Выявлено незначительное стимулирующее влияние 5,0-10,0 мг/л рибавирина на частоту регенерации *in vitro* микропобегов хризантемы садовой. Безвирусные регенеранты были получены на среде с добавлением рибавирина в концентрации 20,0 мг/л. Более высокая концентрация рибавирина – 30,0 мг/л – ингибировала развитие микропобегов, значительно снижая частоту регенерации. Рибавирин в концентрации выше 40,0 мг/л вызывал некротизацию и гибель большинства микропобегов (рис. 2).

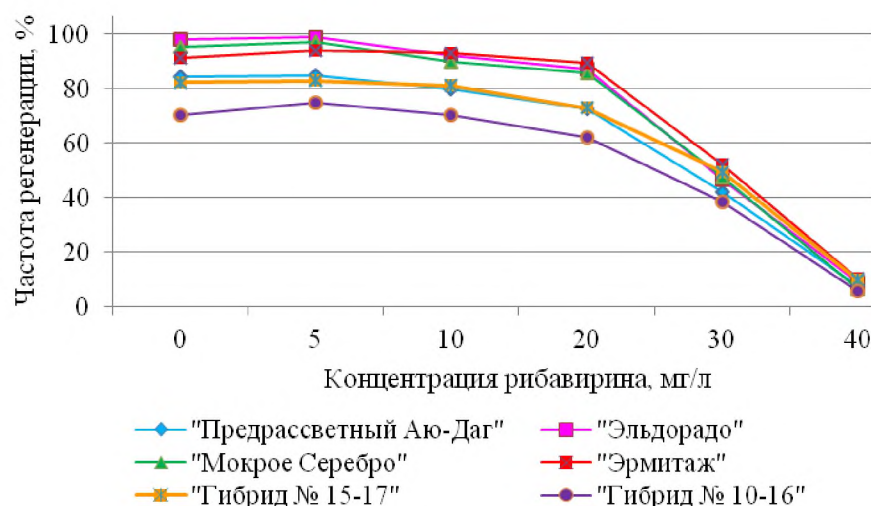


Рис. 2 Влияние разных концентраций рибавирина на частоту регенерации *in vitro* сортов и гибридных форм хризантемы садовой

В экспериментах по изучению морфогенетического потенциала хризантемы садовой были определены оптимальные условия развития эксплантов на модифицированных питательных средах. При этом были отмечены существенные различия в количестве развившихся почек и микропобегов на эксплант, а также в средней длине побегов. Способность к регенерации и множественному побегообразованию изучали, используя различные концентрации цитокининов (БАП или кинетин) в сочетании с ауксином (НУК) в питательной среде МС. Инициация развития меристем происходила на 4-5 сутки культивирования, пазушных почек – через 8-10 суток. Спустя 12–14 суток культивирования у исследуемых сортов и гибридных форм наблюдали прямую регенерацию микропобегов и начало образования адвентивных почек. Пролиферация адвентивных побегов была отмечена через 3-4 недели.

По данным литературных источников [9, 12, 16, 20], авторы сообщали о максимальном количестве эксплантов, дающих пазушные и адвентивные побеги и наибольшее количество микропобегов/эксплант, полученных на МС среде, дополненной 1,0 мг/л БАП. В наших опытах на средах с регуляторами роста БАП или кинетин в концентрациях 1,0-2,0 мг/л активность пролиферации побегов снижалась. При этом процент образования микропобегов не превышал 45-50% из-за формирования микропобегов в базальной части эксплантов. Количество микропобегов/эксплант увеличивалось при невысокой концентрации цитокининов. Максимальное число микропобегов/эксплант получали на средах, где использовали 0,75 мг/л БАП или кинетина. Результаты, полученные нами и представленные в таблице 2, демонстрируют регенерационный потенциал микропобегов исследуемых сортов и гибридных форм хризантемы садовой после 3 и 6 субкультивирований на оптимальных питательных средах, разработанных нами для индукции адвентивных и пазушных почек, микропобегов при клональном микроразмножении 4 сортов и 2 гибридных форм хризантемы садовой. Лучшие результаты были получены на среде МС, дополненной 0,75 мг/л кинетина, 2,5 мг/л аденин сульфата и 0,25 мг/л НУК, индуцирующей множественное образование пазушных и адвентивных почек и микропобегов. Высоким регенерационным потенциалом обладали сорта 'Предрасветный Аю-Даг', 'Эльдорадо', 'Эрмитаж' и гибридные формы № 10-16 и № 15-17. Среди исследуемых сортов

‘Эрмитаж’ и ‘Эльдорадо’ по количеству микропобегов/эксплант (23,5 и 21,0 шт.) и их длине (7,84 и 8,10 см) превосходили другие сорта (табл. 2). В контроле количество микропобегов/эксплант в среднем составило 1-2 шт. В процессе экспериментов на среде МС, дополненной 0,75 мг/л БАП и 0,25 мг/л НУК в основании микропобегов формировался плотный зеленый каллус, из которого были получены адвентивные почки и побеги. Активное развитие микропобегов на этой среде отмечено у сорта ‘Мокрое Серебро’ (21,1 микропобег/эксплант при длине микропобега 5,5 см).

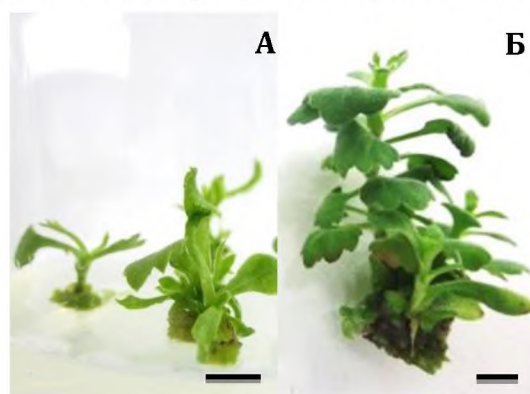


Рис. 3 Формирование адвентивных почек и микропобегов в базальной части микропобегов хризантемы садовой ‘Предрасветный Аю-Даг’ (А) и ‘Мокрое Серебро’ (Б) на питательной среде МС с 0,75 мг/л БАП и 0,25 мг/л НУК. Масштаб 1 см

Таблица 2

Регенерационный потенциал сортов и гибридных форм хризантемы садовой при разных сроках культивирования *in vitro* на питательной среде МС, дополненной регуляторами роста

Сорт, гибридная форма	Субкультивирование	Длина побега, см	К-во дополнительных микропобегов/эксплант, шт.	К-во листьев/эксплант, шт.
<i>Контроль (без регуляторов роста)</i>				
Среднее по сортам	3	1,24 gh	1,48 gh	3,75 i
<i>МС + 0,75 мг/л кинетин + 2,5 мг/л аденин сульфата + 0,25 мг/л НУК</i>				
Гибридная форма № 10-16	3	3,83cd *	17,60 bc	6,24 d
	6	6,47 ab	20,86 ab	21,10ab
Эльдорадо	3	4,54 b	18,50 bc	7,33 cd
	6	8,10 a	21,25 a	22,63 ab
Гибридная форма № 15-17	3	4,42 bc	14,50 de	6,25 d
	6	5,64 ab	19,63 ab	20,45 ab
Предрасветный Аю-Даг	3	3,76 e	10,54 ef	6,10 ef
	6	6,05 ab	19,86 ab	18,05 ab
Эрмитаж	3	4,23 c	18,62 ab	10,50 bc
	6	7,84 a	23,52 a	25,20 a
Мокрое Серебро	3	3,59 ef	14,62 cd	5,17 gh
	6	5,22 ab	18,78 ab	14,20 bc
<i>МС + 0,75 мг/л БАП + 0,25 мг/л НУК</i>				
Гибридная форма № 10-16	3	3,50 c	15,26 ef	5,14 de
	6	4,22 ab	19,25 ab	16,75 ab
Эльдорадо	3	3,98 b	16,89 b	5,20 cd
	6	4,70 ab	19,40 ab	16,67 ab
Гибридная форма № 15-17	3	3,88 bc	11,56 hi	4,25 fg
	6	4,06 ab	15,89 cd	16,84 ab
Предрасветный Аю-Даг	3	2,96 e	11,97 gh	5,80 bc
	6	4,28 ab	15,33 d	15,75 ab
Эрмитаж	3	3,37 d	17,14 ab	6,25 bc
	6	4,77 ab	19,75 ab	18,40 a
Мокрое Серебро	3	4,22 ab	16,68 bc	6,67 b

	6	5,33 а	24,50 а	20,25 а
--	---	--------	---------	---------

*Среднее значение, обозначенное одной и той же буквой в столбцах, достоверно не отличается при уровне значимости $P < 0,05$ при использовании критерия многогранного теста Дункана.

Таким образом, наши исследования подтверждают данные ряда авторов о том, что индукция морфогенеза и пути реализации морфогенетического потенциала зависят от происхождения, типа исходного экспланта и условий культивирования хризантемы садовой [3, 10, 11, 18, 19, 21].

Большой выход нормально развитых растений отмечали в апреле-августе и в октябре-ноябре, что, прежде всего, связано с состоянием маточных растений, с которых сняты сегменты побегов и изолированы меристемы. Укоренение микропобегов на питательной среде с кинетином и аденин сульфатом происходило спонтанно, что позволяет значительно ускорить процесс размножения (рис. 4).

Миниатюрные растеньица высотой 3-4 см с хорошо развитой корневой системой после ретестирования пересаживали в почвенный субстрат (рис. 4). Адаптацию проводили в изолированной теплице со стабильными условиями: температурой 20-22°C, относительной влажностью воздуха 70-80%, фотопериодом 14-16 часов, освещенностью $37,5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ в первые 10 суток и $40,0-42,5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ в последующие дни. Оздоровленные регенеранты высаживали на адаптацию в вазоны объемом 0,25 л со смесью торфа (pH 5,0-5,6) и перлита в соотношении 2:1. Ретестирование на отсутствие вирусов проводили, когда высота надземной части растений достигала 15 см.

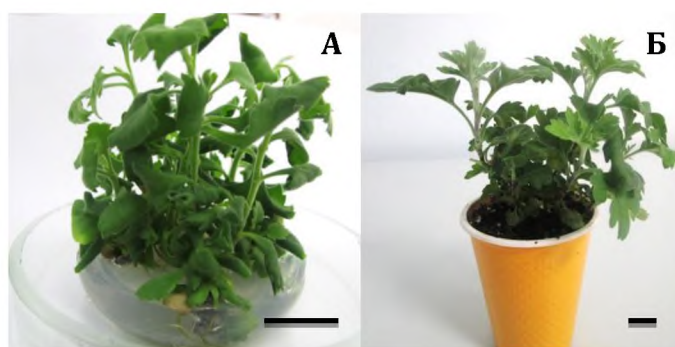


Рис. 4 Спонтанное корнеобразование на среде MS с $0,75 \text{ mg L}^{-1}$ кинетина, $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ аденин сульфата и $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ НУК (А) и *ex vitro* адаптированные регенеранты хризантемы садовой ‘Эльдорадо’. Масштаб 1 см

Выводы

Изучен морфогенетический потенциал и показана возможность прямой регенерации хризантемы садовой сортов ‘Мокрое Серебро’ ‘Предрассветный Аю-Даг’, ‘Эльдорадо’, ‘Эрмитаж’ и гибридных форм № 10-16 и № 15-17 из меристемы и сегментов побегов с узлом в зависимости от гормональных факторов культивирования. Выявлена индуцирующая роль регуляторов роста кинетина ($0,75 \text{ мг/л}$), БАП ($0,75 \text{ мг/л}$), аденин сульфата ($2,5 \text{ мг/л}$) и НУК ($0,25 \text{ мг/л}$) в питательной среде МС, обеспечивающих стабильную регенерацию микропобегов. Установлено, что сорта ‘Эльдорадо’ и ‘Эрмитаж’ обладали более высоким регенерационным потенциалом по сравнению с другими генотипами. Показана возможность корнеобразования и адаптации регенерантов исследуемых сортов хризантемы. Разработанные протоколы микроразмножения позволяют повысить эффективность размножения и сохранения *in vitro* 4 сортов хризантемы садовой.

Работа выполнена на базе Уникальной научной установки «Научный центр биотехнологии, геномики и депонирования растений» (УНУ «ФИТОБИОГЕН») в рамках Госзадания № 0829-2019-0038 ФГБУН «НБС-ННЦ»

Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р.Г. Бутенко – М.: Наука, 1964. – 272 с.
2. Закубанский А.В., Чирков С.Н., Митрофанова О.В., Митрофанова И.В. Вирусы некоторых ценных плодовых, эфиромасличных и декоративных культур (обзор) // Бюллетень ГНБС. – 2016. – Вып. 121. – С. 7-18. – [Электронный ресурс]. – [http://bult.nbgnsr.ru/download/121\(2\)/1-121-2016.pdf](http://bult.nbgnsr.ru/download/121(2)/1-121-2016.pdf)
3. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Иванова Н.Н. Биотехнологии в оздоровлении растений и размножение безвирусного посадочного материала перспективных цветочно-декоративных культур // Методология биотехнологических исследований цветочно-декоративных культур: Коллективная монография / под общ. ред. д.б.н. И.В. Митрофановой. – Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2018. – С. 43-152. DOI: 10.32514/978-5-907118-58-4
4. Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Иванова Н.Н., Егорова Н.А., Кузьмина Т.Н., Лесникова-Седошенко Н.П., Тевфик А.Ш., Челомбит С.В. Этапы регенерации *in vitro* декоративных, ароматических и плодовых культур // Основы создания генобанка *in vitro* видов, сортов и форм декоративных, ароматических и плодовых культур: Коллективная монография / под общ. ред. И.В. Митрофановой. – Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2018. – С. 27-126.
5. Смыкова Н.В., Копань Ю.Г., Андриюшенкова З.П. Хризантемы Никитского ботанического сада. – Симферополь: Н. Оріанда, 2013. – 88 с.
6. Улановская И.В., Смыкова Н.В., Андриюшенкова З.П. Аннотированный каталог цветочно-декоративных растений коллекции Никитского ботанического сада. Том III. Коллекция хризантемы садовой, ириса гибридного / под общей ред. чл.-корр. РАН Ю.В. Плугатаря – Симферополь: ИТ "АРИАЛ", 2018. – 232 с.
7. Banu N.A., Hossain M., Islam R., Biswas S.K. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.: an *in vitro* Plantlets Regeneration Protocol // Plant Environment Development. – 2014. – Vol. 3. – No. 2. – P. 36-39.
8. Datta S.K. *Chrysanthemum morifolium* Ramat. – a unique genetic material for breeding // Sci. Culture. – 2013. – Vol. 79. – No. 7-8. – P. 307-313.
9. Hemlata C., Mahdi A. Optimization of Plant Growth Regulators for Rapid *Chrysanthemum Morifolium* Shoot Multiplication // Intl. J. Scientific Research and Reviews. – 2016. – Vol. 5. – No. 1. – P. 109-114. DOI:10.21859/ijb.1454
10. Kaul V., Miller R.M., Hutchinson J.F., Richards D. Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendrathera grandiflora* Tzvelev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.) // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 1990. – Vol. 21. – No. 1. – P. 21-30. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00034487>
11. Kazeroonian R., Mousavi A., Jari S.K., Tohidfar M. Factors Influencing *in vitro* Organogenesis of *Chrysanthemum morifolium* cv Resomee Splendid - Iranian J Biotech. – 2018. – Vol. 16. – No. 2. – P. 1454
12. Kereša S., Mihovilović A., Barić M., Židovec V., Skelin M. The micropropagation of chrysanthemums via axillary shoot proliferation and highly efficient plant regeneration by somatic embryogenesis. African J. Biotechnology. – 2012. – Vol. 11. – No. 22. – P. 6027-6033. DOI: <http://dx.doi.org/10.5897/AJB10.1976>
13. Kyte L., Kleyn J., Scoggins H., Bridgen M. Plants from test tubes: An introduction of micropropagation. 4th ed. - Portland, Oregon: Timber Press, 2013. – 274 p.

14. Mitrofanova I.V., Zakubanskiy A.V., Mitrofanova O.V. Viruses infecting main ornamental plants: an overview // Ornamental Horticulture. – 2018. – Vol. 24. – No. 2. – P. 95-102. DOI: <https://doi.org/10.14295/oh.v24i2/1199>
15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiologia Plantarum. – Vol. 15. – No. 3. – P. 473-497. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
16. Nalini R., Anjana J.M., Arathi C.S., Aswathy M., Ayana B., Bhuvaneswari R. Effect of growth regulators on micropropagation of Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Ramat.) // Scrutiny Intl. Research J. Agricult., Plant Biotechnology and Bio Products. – 2016. – Vol. 3. – No. 4. – P. 7-9. – [Электронный ресурс]. – <http://www.scrutinyjournals.com>
17. Rout G.R., Mohapatra A., Jain S.M. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects // Biotechnology Advances. – Vol. 24. – P. 531-560. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.05.001>
18. Sarasan W., Cripps G., Ramsay M., Atherton C., McMichen M., Prendergast G., Rowntree J. Conservation *in vitro* of threatened plants – progress in the past decade // In Vitro Cell. Biol. Plant. – 2006. – Vol. 42. – No. 3. – P. 206-214. DOI: <http://doi.org/10.1079/IVP2006769>
19. Swarna R.J., Yeasmin D., Md. Rahman M., Md. Alam F. Protocol on direct organogenesis in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. // Int. J. Biosci. – 2016. – Vol. 9. – No. 4. – P. 123-137. DOI: <http://dx.doi.org/10.12692/ijb/9.4.123-1237>
20. Teixeira da Silva J.A., Kulus D. Chrysanthemum biotechnology: discoveries from the recent literature // Folia Hort. – 2014. – Vol. 26. – No. 2. – P. 67-77. DOI: <http://dx.doi.org/10.2478/fhort-2014-0007>
21. Waseem K., Jilani M.S., Khan M.S., Kiran M., Khan G. Efficient *in vitro* regeneration of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* L.) plantlets from nodal segments // Afr. J. Biotechnol. – 2011. – Vol. 10. – No. 8. – P. 1477-1484. DOI: <http://dx.doi.org/10.5897/AJB09.1820>
22. Yesmin S., Hashem A., Das K.C., Hasan M.M., Islam M.S. Efficient *in vitro* regeneration of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) through nodal explant culture // Nuclear Science and Applications. – 2014. – Vol. 23. – No. 1-2. – P. 47-50.

Статья поступила в редакцию 10.08.2020 г.

Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Smykova N.V. *In vitro* cleaning up and micropropagation of perspective chrysanthemum cultivars and new hybrid forms of the Nikita Botanical Gardens' breeding // Bull. Of the State Nikita Botan. Gard. – 2021. – № 138. – P. 92-100

An *in vitro* micropropagation protocol has been developed for garden chrysanthemum cultivars Mokroe Serebro, Predrassvetniy Ayu-Dag, Eldorado, and Ermitage of the NBG's breeding. 10-20 mg/l of ribavirin promoted the primary explants cleaning up. A high frequency of regeneration of adventitious buds and microshoots was observed in cultivars Eldorado and Ermitage (21.0 and 23.5 microshoots/explant) cultured on MS medium with 0.75 mg/l kinetin and Mokroe Serebro – on MS medium with 0.75 mg/l BAP (24.5 microshoots/explant). Spontaneous root formation facilitated 100% rooting of microshoots.

Key words: *Chrysanthemum × morifolium*; explant; ribavirin; *in vitro* regeneration