

УДК 582.998.2:57.085.2

DOI: 10.25684/0513-1634-2023-149-39-49

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ХРИЗАНТЕМЫ САДОВОЙ *IN VITRO*

**Наталья Николаевна Иванова, Нина Павловна Лесникова-Седошенко,
Ирина Васильевна Жданова, Наталья Владимировна Смыкова,
Наталья Васильевна Корзина**

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН
298648, Республика Крым, г. Ялта, пгт Никита, спуск Никитский, 52
E-mail: nnivanova2017@yandex.ru

Хризантема садовая – известная и широко распространенная цветочная культура. Исследуемые сорта хризантемы голландской селекции 'Kiko' и 'Ziveno' являются высокодекоративными и перспективными для выращивания в коммерческих целях. Их вегетативное размножение черенкованием малоэффективно, что требует использования современных биотехнологических методов массового размножения. Изучены пути морфогенеза *in vitro* двух сортов хризантемы. Определены оптимальные концентрации регуляторов роста 6-бензиламинопурина и 6-фурфуриламинопурина в питательной среде МС, позволившие получить нормально развитые адвентивные микропобеги. Высокая частота адвентивного побегообразования отмечена на среде с 1,0 мг/л 6-бензиламинопурина. Количество дополнительных побегов через 30 суток культивирования составило $4,9 \pm 0,53$ и $2,70 \pm 0,37$ шт./эксплант у сортов 'Kiko' и 'Ziveno', соответственно. Установлены оптимальные значения интенсивности освещения, спектрального состава света и температуры при культивировании *in vitro*. Показан различный морфогенетический ответ изучаемых сортов на условия культивирования. Оптимизирована питательная среда для ризогенеза *in vitro* двух сортов хризантемы садовой. Установлено, что лучшее укоренение микропобегов происходило на среде 1/2 МС, дополненной 0,5 мг/л индоллил-3-уксусной кислоты или 0,5 мг/л α -нафтилуксусной кислоты. Укорененные растения адаптированы в условиях *ex vitro*.

Ключевые слова: *Chrysanthemum* $\times$ *morifolium* Ramat.; морфогенез *in vitro*; эксплант; регуляторы роста; интенсивность освещения; температура

Введение

Хризантема садовая (*Chrysanthemum* $\times$ *morifolium* Ramat., Asteraceae) входит в число ведущих культур мирового промышленного цветоводства. Богатство сортимента и продолжительное цветение обеспечили хризантеме постоянный спрос. Многочисленные иностранные сорта-новинки хризантемы садовой высокодекоративны, но обладают низким коэффициентом вегетативного размножения [4, 5]. При выращивании таких сортов в других климатических условиях, особенно в открытом грунте, часто проявляются их низкие адаптационные качества. Одними из таких сортов являются крупноцветковые сорта голландской селекции 'Kiko' и 'Ziveno', интродуцированные в коллекцию Никитского ботанического сада в 2015-2018 гг. В последние годы, как альтернативный метод размножения хризантемы, все шире применяют культуру органов и тканей *in vitro*. В работах ряда авторов рассматриваются различные аспекты клонального микроразмножения хризантемы, в том числе применение регуляторов роста растений в питательных средах и условия культивирования. Показаны пути морфогенеза *in vitro* отдельных сортов хризантемы через органогенез [7, 11-14, 26, 29], каллусогенез [24, 26], соматический эмбриогенез [8, 10, 15, 21]. Применение биотехнологических методов может быть использовано для размножения свободного от патогенов посадочного материала хризантемы и сохранения генофонда [3, 28]. На морфогенез растений может также оказывать влияние правильный выбор освещения, которое влияет на фоторецепторы растений, и температуры культивирования *in vitro* [16]. А. Kurilčik с соавторами описали влияние спектра и качества света на процессы геммогенеза и ризогенеза у *Chrysanthemum* $\times$ *morifolium* Ramat [17, 18].

Целью настоящего исследования было изучение особенностей морфогенеза *in vitro* двух интродуцированных высокодекоративных крупноцветковых сортов хризантемы садовой 'Kiko' и 'Ziveno'.

Объекты и методы исследования

Исследования выполнены в лаборатории морфогенеза и депонирования растений *in vitro* ФГБУН «НБС-ННЦ». Объектом для исследований служили растения хризантемы садовой сортов 'Kiko' и 'Ziveno' из коллекции НБС-ННЦ. Сорт 'Kiko' растения среднерослые, высотой 75-90 см; цветоносные побеги средне-прочные, прямые, умеренно облиственные; листья зеленые, среднелопастные, средние по размеру. Соцветия сиренево-лиловые, оригинальной пауковидной формы, махровые, 18,0-23,0 см в диаметре. Сорт среднепозднего срока цветения: начало цветения – I декада ноября. Рекомендуется для срезки цветов. Сорт 'Ziveno' растения среднерослые, высотой 65-95 см, цветоносные побеги прочные, прямые, умеренно облиственные; листья темно-зеленые, среднелопастные, средние по размеру. Соцветия кремово-зеленовато-белые, лучевидно-анемоновидной формы, махровые, 12,0-14,5 см в диаметре. Сорт среднепозднего срока цветения: начало цветения конец октября – I декада ноября. Рекомендуется для срезки цветов.



Рис. 1 Цветущие растения хризантемы садовой сортов 'Kiko' (А) и 'Ziveno' (Б)

В работе применяли общепринятые методы исследований в биотехнологии [1, 2]. Побеги отбирали с растений хризантемы садовой, выращенных в открытом грунте на коллекционном участке НБС-ННЦ. Растительный материал тщательно промывали под проточной водой, затем помещали в емкость с дистиллированной водой и моющим средством. После этого 3-4 раза промывали дистиллированной водой. Сегменты побегов с 2-3 узлами поверхностно стерилизовали в асептических условиях ламинарного бокса (ESCO, Сингапур). Их погружали на 1 мин в 70% этанол, затем на 15 мин в раствор 1% Thimerosal, и на 20 мин в 0,3-0,4% раствор ДезТаб (трихлоризоциануровая кислота и натриевая соль дихлоризоциануровой кислоты, активный хлор (48-53%) с добавлением 2-3 капель детергента Tween 20. По окончании стерилизации материал промывали 3-4 раза дистиллированной водой для удаления остатков реагентов. Апикальные и латеральные почки размером 3-5 мм вычленили и помещали на агаризованную питательную среду МС (Murashige, Skoog, 1962) [20], содержащую 1,0 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП) и 0,25 мг/л α -нафтилуксусной кислоты (НУК). Для изучения морфогенетического потенциала в качестве исходных эксплантов использовали апикальную часть микропобегов *in vitro* длиной 1,0 см. Экспланты культивировали на питательной среде МС, которую дополняли 0,5; 1,0; 1,5 мг/л 6-БАП или 0,5; 1,0; 1,5 мг/л 6-фурфуриламинопурина (кинетин) и 2,5 мг/л 6-аминопурина (аденин сульфат). Все варианты среды были дополнены 0,05 мг/л НУК. Среда содержала 30 г/л сахарозы. pH среды доводили до 5,7 перед добавлением 9,0 г/л

агара и автоклавировали при температуре 120°C в течение 10-15 минут. Культуральные сосуды с эксплантами помещали в фитокапсулы «Биотрона» с температурой $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 16-часовым фотопериодом и освещенностью $37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ холодным белым светом люминесцентных ламп (OSRAM, Россия). В конце эксперимента, после 30 суток культивирования, определяли среднюю длину микропобегов и среднее число адвентивных микропобегов/эксплант.

В опытах по изучению влияния интенсивности освещения и спектрального состава света применяли белый и красный спектры света люминесцентных ламп с интенсивностью освещения 46,25; 56,0; 64,75 и $74,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ и светодиодный красный (56,0; 64,75 и $74,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) при температуре 23°C и 16-часовом фотопериоде. Опыты по влиянию температуры культивирования на процессы морфогенеза изучаемого вида проводили при температурах 22°C , 23°C , 24°C и 25°C , белом спектре света с интенсивностью освещения $37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Экспланты культивировали на среде МС, дополненной 0,5 мг/л БАП и 0,05 мг/л НУК.

Микропобеги для укоренения помещали на среду $\frac{1}{2}$ МС, дополненную ауксинами: 0,5 мг/л НУК; 0,5 мг/л β -индолилуксусной кислоты (ИУК); 0,5 мг/л НУК + 0,5 мг/л ИУК. Контролем была среда без регуляторов роста. Культуральные сосуды с эксплантами содержали в фитокапсуле «Биотрона» при температуре $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 16-часовом фотопериоде и освещенности $37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Через 30 суток подсчитывали среднее количество сформировавшихся корней/эксплант и их длину.

Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием программы STATISTICA for Windows 10.0 (StatSoft, Inc.). Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартная ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

Инициация развития почек двух изучаемых сортов хризантемы садовой происходила на 10-12 сутки культивирования. Через 2 недели наблюдали рост и развитие основного побега и образование адвентивных почек в основании эксплантов. Пролиферацию адвентивных побегов отмечали спустя 3-4 недели. Количество полученных микропобегов/эксплант составило 2-3 шт. при первом субкультивировании (табл. 1).

Таблица 1

Влияние различных концентраций регуляторов роста в питательной среде МС на дифференциацию адвентивного побегообразования двух сортов хризантемы садовой

Концентрация регуляторов роста в среде МС, мг/л	Средняя длина побега, см		Количество адвентивных побегов/эксплант, шт.	
	'Kiko'	'Ziveno'	'Kiko'	'Ziveno'
контроль	$2,35 \pm 0,24$	$2,19 \pm 0,17$	0	0
0,5 6-БАП + 0,05 НУК	$2,20 \pm 0,12$	$2,40 \pm 0,13$	$2,80 \pm 0,88$	$1,60 \pm 0,22$
1,0 6-БАП + 0,05 НУК	$2,30 \pm 0,18$	$2,48 \pm 0,06$	$4,90 \pm 0,53$	$2,70 \pm 0,37$
1,5 6-БАП + 0,05 НУК	$2,28 \pm 0,07$	$2,40 \pm 0,11$	$4,60 \pm 0,48$	$2,20 \pm 0,42$
0,5 кинетина + 2,5 аденин сульфата + 0,05 НУК	$2,0 \pm 0,12$	$1,95 \pm 0,08$	$1,80 \pm 0,46$	$1,10 \pm 0,50$
1,0 кинетина + 2,5 аденин сульфата + 0,05 НУК	$3,18 \pm 0,21$	$2,03 \pm 0,15$	$2,0 \pm 0,30$	$1,30 \pm 0,33$
1,5 кинетина + 2,5 аденин сульфата + 0,05 НУК	$3,36 \pm 0,31$	$2,88 \pm 0,11$	$2,30 \pm 0,26$	$1,90 \pm 0,23$

Исследования по влиянию регуляторов роста показали, что на всех вариантах питательных сред наблюдали высокую частоту образования адвентивных почек и побегов, однако их количество по вариантам опыта менялось. Пролиферация микропобегов происходила на вариантах среды МС с различной концентрацией цитокининов: 6-БАП или кинетина. Так, максимальное среднее количество побегов на среде МС, дополненной 1,0 мг/л 6-БАП и 0,05 мг/л НУК, составило $4,90 \pm 0,53$ у сорта 'Kiko' и $2,70 \pm 0,37$ шт./эксплант у сорта 'Ziveno', средняя длина основного микропобега достигала $2,30 \pm 0,18$ и $2,48 \pm 0,06$ см, соответственно (табл. 1).

Наименьшее среднее количество развившихся адвентивных побегов отмечали на среде с 0,5 мг/л 6-БАП + 0,05 мг/л НУК: $2,80 \pm 0,88$ и $1,60 \pm 0,22$ микропобега/эксплант у сортов 'Kiko' и 'Ziveno', при этом средняя длина основного микропобега была $2,20 \pm 0,12$ и $2,40 \pm 0,13$ см, соответственно. Увеличение концентрации 6-БАП до 1,5 мг/л поддерживало достаточно высокий уровень адвентивного побегообразования. Однако визуальные наблюдения выявили некоторые морфологические изменения: формировались оводненные микропобеги с утолщенными листовыми пластинками и стеблями. Такие побеги в дальнейшем не использовали при микрочеренковании *in vitro*. Нами было установлено, что среда МС с 1,0 мг/л 6-БАП и 0,05 мг/л НУК была наилучшей для адвентивного побегообразования двух изучаемых сортов хризантемы.

Полученные нами данные согласуются с результатами других исследователей. Так, R.J. Swarna с соавторами [23] наилучшие показатели роста и развития побегов хризантемы отмечали на питательной среде МС, содержащей 1,0 мг/л 6-БАП. X. Wang и др. [25] для микроразмножения хризантемы 'Breeze Ivory' предложили состав питательной среды МС, дополненной 1,0 мг/л 6-БА и 0,1 мг/л НУК, при этом коэффициент размножения составил 12,1. Наши результаты также схожи с результатами A. Gul и K. Waseem, которые получили аналогичные данные для верхушек побегов при культивировании на питательной среде МС с концентрацией 6-БАП 1,0 мг/л [9, 26]. Авторы рекомендуют использовать 1,0 мг/л 6-БАП как оптимальную концентрацию для регенерации проростков и отмечают, что при увеличении или уменьшении этой концентрации наблюдается уменьшение коэффициента размножения. Различия с результатами других исследователей могут объясняться различными генотипами растений, использовавшихся в исследованиях. У хризантемы возможно индуцировать адвентивное побегообразование, используя невысокие концентрации 6-БАП (0,5 мг/л) и НУК (0,01 мг/л) в модифицированной среде МС. Имеется ряд работ, показывающих, что среда МС с разными концентрациями и комбинациями 6-БАП и НУК была эффективна для пролиферации микропобегов, полученных из разных типов эксплантов хризантемы [7, 12].

В наших опытах индукция побегообразования у эксплантов также происходила на среде МС, дополненной 1,5 мг/л кинетина и 0,05 мг/л НУК: в среднем было получено $2,30 \pm 0,26$ адвентивных побегов/эксплант для сорта 'Kiko' и $1,90 \pm 0,23$ шт./эксплант для сорта 'Ziveno'. Наибольшая средняя длина побега была у сорта 'Kiko' ($3,36 \pm 0,31$ см) (см. табл. 1). Присутствие в среде 0,5-1,0 мг/л кинетина совместно с 0,05 мг/л НУК также способствовало инициации побегообразования у обоих сортов. Однако при этом в базальной части микропобегов формировался плотный каллус зеленого цвета диаметром 3 мм. В контроле наблюдали рост основного побега без образования адвентивных почек и побегов. Результаты опытов показали различный морфогенетический ответ на содержание регуляторов роста в питательной среде двух изучаемых сортов хризантемы садовой (см. табл. 1). Таким образом, в условиях *in vitro* сорт 'Kiko' оказался более пластичным по сравнению с сортом 'Ziveno'.

Известно, что интенсивность освещения, спектр света, фотопериод, температура играют важную роль в процессе роста и развития растений *in vitro* [7, 16, 19, 22]. Наши

исследования подтвердили, как индуцирующую, так и ингибирующую роль интенсивности освещения, спектра света и температуры на органогенез изучаемых сортов хризантемы садовой в условиях *in vitro*.

Экспланты развивались во всех вариантах опыта. Применение белого, красного спектра света, а также светодиодных ламп с интенсивностью освещения $56,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ было наиболее эффективным для роста микропобегов сорта 'Kiko'. При этом получено наибольшее количество адвентивных побегов: 3,50-3,60 шт./эксплант. Максимальная длина побегов достигала 2,75 см при $56,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ белого света и 2,83 см при светодиодном красном свете интенсивностью $64,7 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (табл. 2). Подобные результаты с использованием красных светодиодных ламп были получены А. Kurilčik с соавторами [17, 18]. Количество листьев достигало 13,66 шт. и 12,33 шт. при белом и красном спектре света интенсивностью $56,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, соответственно. Следует отметить, что для эксплантов сорта 'Ziveno' эти показатели были ниже. Наибольшее среднее количество адвентивных побегов образовалось при использовании белого света интенсивностью $46,25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (1,97 шт.), красного спектра света интенсивностью $56,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (1,86 шт.) и светодиодных ламп интенсивностью $74,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (1,83 шт.). Наибольшее количество листьев (9,70 шт.) отмечали при культивировании с использованием светодиодных красных ламп ($64,75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Таблица 2

Морфометрические показатели двух сортов хризантемы садовой при различных режимах освещенности и спектре света

Спектр света и интенсивность освещения, $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Длина микропобега, см		Количество адвентивных микропобегов/эксплант, шт.	
	'Kiko'	'Ziveno'	'Kiko'	'Ziveno'
Белый спектр света				
46,25	$2,30 \pm 0,37$	$2,40 \pm 0,16$	$2,90 \pm 0,34$	$1,97 \pm 0,37$
56,0	$2,75 \pm 0,14$	$2,19 \pm 0,06$	$3,50 \pm 0,11$	$1,60 \pm 0,38$
64,75	$2,47 \pm 0,26$	$1,98 \pm 0,7$	$2,87 \pm 0,13$	$1,56 \pm 0,20$
74,0	$2,54 \pm 0,08$	$2,20 \pm 0,20$	$2,75 \pm 0,23$	$0,97 \pm 0,31$
Красный спектр света				
56,0	$2,60 \pm 0,27$	$2,31 \pm 0,20$	$3,54 \pm 0,14$	$1,86 \pm 0,12$
74,0	$2,40 \pm 0,16$	$2,39 \pm 0,10$	$3,0 \pm 0,19$	$1,18 \pm 0,24$
Светодиодный				
56,0	$2,67 \pm 0,24$	$1,90 \pm 0,05$	$3,60 \pm 0,29$	$1,49 \pm 0,63$
64,75	$2,67 \pm 0,21$	$2,83 \pm 0,11$	$3,10 \pm 0,34$	$1,68 \pm 0,13$
74,0	$2,23 \pm 0,18$	$2,17 \pm 0,27$	$3,23 \pm 0,18$	$1,83 \pm 0,70$

Установлено, что красный спектр света интенсивностью $56,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ индуцировал рост адвентивных побегов у обоих сортов, образование дополнительных побегов и листьев с нормальной морфологией. Полученные результаты демонстрируют, что спектральное качество света влияет на морфогенез растений хризантемы садовой. Так при использовании белого света интенсивностью 46,25 и $56,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ получено 2,90-3,50 шт. адвентивных микропобега/эксплант у сорта 'Kiko' и 1,97-1,60 шт. – у сорта 'Ziveno' длиной 2,30-2,75 см и 2,40-2,19 см, соответственно. С ростом интенсивности освещения отмечали незначительное снижение количества пролиферирующих побегов и снижение их длины у обоих сортов хризантемы садовой. Максимальное количество дополнительных побегов получено у изучаемых сортов при использовании красного света $56,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$: 3,54 шт. у сорта 'Kiko' и 1,86 шт. у сорта 'Ziveno'. При этом не наблюдали значительных различий в длине побегов в вариантах опыта (табл. 2).

Известно, что растения при различной температуре могут вести себя по-разному. Влияние температуры на различные физиологические процессы, такие как дыхание и фотосинтез, хорошо известно, и оказывает значительное воздействие на культуру тканей растений и микроразмножение [7, 16, 22]. Наши наблюдения за развитием растений показали, что разные сорта по-разному реагировали на температуру культивирования. Отмечены существенные различия в среднем количестве микропобегов и листьев на эксплант, средней длине микропобегов, количестве и длине корней. Так, у сорта 'Kiko' после 30 суток культивирования лучшие результаты получены при 22°C. Количество дополнительных побегов составило $2,40 \pm 0,17$ - $2,60 \pm 0,21$ шт./побег, длиной $2,20 \pm 0,10$ - $2,49 \pm 0,13$ см, с $11,0 \pm 1,07$ - $11,3 \pm 0,94$ темно-зелеными листьями. Наряду с этим отмечали формирование $1,30 \pm 0,36$ - $1,70 \pm 0,36$ шт. корней длиной 1,0-3,5 см (табл. 3).

Оптимальной температурой для роста и развития растений сорта 'Ziveno' была 25°C. Количество адвентивных побегов составило в среднем 1,48-1,62 шт./эксплант, количество листьев – 6,87 и 10,0 шт., среднее количество корней 3,0 шт. длиной 2,0-4,0 см, соответственно (см. табл. 3, рис. 2). С повышением температуры у сорта 'Ziveno' увеличивалось количество адвентивных побегов и их длина. При этом был выявлен различный ответ у двух изучаемых сортов хризантемы садовой: при повышении температуры с 22 до 25°C индукция адвентивного побегообразования у сорта 'Kiko' снижалась (см. табл. 3).

В ряде публикаций представлены данные, подтверждающие, что оптимальные температуры культивирования варьируют в зависимости от генотипа растения [7, 16].

Таблица 3

Влияние температуры на морфогенетический потенциал и морфометрические показатели растений двух сортов хризантемы садовой

Температура, °C	Морфометрические показатели			
	Длина побега, см	Количество дополнительных побегов, шт.	Количество листьев, шт.	Количество корней, шт.
Сорт 'Kiko'				
22	$2,20 \pm 0,10$	$2,60 \pm 0,43$	$11,30 \pm 0,94$	$1,70 \pm 0,36$
23	$2,49 \pm 0,13$	$2,40 \pm 0,16$	$11,0 \pm 1,07$	$1,30 \pm 0,36$
24	$2,35 \pm 0,07$	$1,56 \pm 0,12$	$9,11 \pm 0,84$	$1,11 \pm 0,30$
25	$2,17 \pm 0,13$	$1,77 \pm 0,24$	$9,6 \pm 0,85$	$1,0 \pm 0,29$
Сорт 'Ziveno'				
22	$1,98 \pm 0,10$	$1,0 \pm 0,18$	$6,87 \pm 0,83$	$3,0 \pm 0,37$
23	$2,05 \pm 0,26$	$1,40 \pm 0,12$	$9,0 \pm 0,077$	$2,75 \pm 0,25$
24	$2,55 \pm 0,42$	$1,48 \pm 0,20$	$10,0 \pm 0,94$	$3,0 \pm 0,26$
25	$2,76 \pm 0,23$	$1,62 \pm 0,24$	$11,62 \pm 0,96$	$3,0 \pm 0,26$

Таким образом, физические факторы культивирования, такие как интенсивность освещения, качество света и температура культивирования, оказывают значительное влияние на морфогенез *in vitro* изучаемых сортов хризантемы.

Ризогенез – последний и наиболее сложный этап клонального микроразмножения, от которого зависит эффективность предлагаемой технологии. На данном этапе необходимо создать наиболее оптимальный состав питательной среды, обеспечивающий получение высокого процента укорененных микропобегов. Для этого уменьшают концентрацию минеральных солей, сахарозы в питательной среде, а также исключают из нее цитокинины [6, 7, 22].

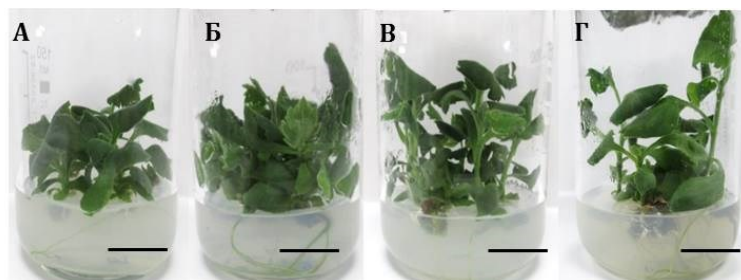


Рис. 2 Влияние температуры на морфогенез эксплантов хризантемы садовой сорта 'Ziveno' после 30 суток культивирования при различной температуре:
 А – 22°C; Б – 23°C; В – 24°C; Г – 25°C

Основным фактором, индуцирующим ризогенез, является присутствие в составе питательной среды ауксинов. Наиболее часто используют ИМК, НУК или ИУК в различных концентрациях и сочетаниях. Выбор регулятора роста и его концентрации зависит от видовых и сортовых особенностей исследуемых растений. Нами было изучено влияние ауксинов НУК и ИУК и их комбинаций на укоренение микропобегов хризантемы садовой сортов 'Kiko' и 'Ziveno'. На всех испытанных вариантах среды процент укорененных растений составил 96-98%. Отмечены сортовые особенности ризогенеза растений хризантемы садовой на испытанных вариантах сред (табл. 4).

Таблица 4

Влияние ауксинов в питательной среде ½ МС на ризогенез растений двух сортов хризантемы садовой

Сорт	Биометрические показатели	Состав питательной среды			
		½ МС (контроль)	½ МС+0,5 мг/л ИУК	½ МС+0,5 мг/л НУК	½ МС+0,5 мг/л ИУК+0,5 мг/л НУК
'Kiko'	длина побега, см	2,57 ± 0,09	2,07±0,09	2,03±0,04	1,92±0,03
	количество корней, шт./побег	10,0 ± 0,26	11,0±0,37	7,83±0,17	8,0±0,26
	длина корня, см	5,74±0,35	4,72±0,16	1,03±0,06	1,60±0,04
'Ziveno'	длина побега, см	2,35±0,043	2,12±0,05	2,08±0,05	2,25±0,87
	количество корней, шт./побег	12,33±0,33	8,50±0,22	14,0±0,89	8,83±0,31
	длина корня, см	3,68±0,16	3,25±0,34	1,40±0,06	1,47±0,04

Максимальное количество корней у растений сорта 'Kiko' сформировалось на среде ½ МС + 0,5 мг/л ИУК (в среднем 11,0 ± 0,37 шт./побег длиной 4,72 ± 0,16 см). Наибольшее количество корней у сорта 'Ziveno' получено на среде, содержащей 0,5 мг/л НУК (в среднем 14,0 шт. шт./побег, длиной 1,40 ± 0,89 см) (рис. 3). Совместное применение в среде 0,5 мг/л ИУК + 0,5 мг/л НУК было менее эффективным по сравнению другими вариантами опыта. В контроле максимальное количество корней сформировалось у сортов 'Ziveno' и 'Kiko' (12,33 и 10,0 шт./побег, соответственно) (см. рис. 3).



Рис. 3 Ризогенез у растений хризантемы садовой сортов 'Kiko' (А) 'Ziveno' (Б) в условиях *in vitro* на вариантах питательной среды:

1 – контроль ($\frac{1}{2}$ МС); 2 – $\frac{1}{2}$ МС + 0,5 мг/л ИУК; 3 – $\frac{1}{2}$ МС + 0,5 мг/л НУК;
4 – $\frac{1}{2}$ МС + 0,5 мг/л ИУК + 0,5 мг/л НУК

Показано, что у исследуемых сортов, наряду с формированием главного корня, происходило активное развитие боковых корней, что имеет большое значение при дальнейшей адаптации растений к условиям *ex vitro* и *in vivo*. Полученные растения были хорошо облиственные, без признаков оводненности, что обеспечило высокую жизнеспособность регенерантов хризантемы садовой после пересадки в нестерильные условия выращивания. Все укорененные растения успешно прошли акклиматизацию в условиях *ex vitro*.

Выводы

Результаты исследований, полученные нами, показали влияние генотипа, регуляторов роста в питательной среде МС, интенсивности освещения, спектра света и температуры на морфогенез *in vitro* двух сортов хризантемы садовой. На всех этапах микроразмножения четко прослеживались сортовые различия. Установлена оптимальная концентрация цитокинина 6-БАП – 1,0 мг/л в среде МС для индукции множественного адвентивного побегообразования. Через 30 сут культивирования получено в среднем $4,90 \pm 0,53$ и $2,70 \pm 0,37$ дополнительных микропобегов/эксплант у сортов 'Kiko' и 'Ziveno', соответственно. Наличие в среде 0,5-1,5 мг/л кинетина способствовало росту основного побега, однако при этом снижалось число адвентивных микропобегов, по сравнению с вариантами среды, содержащими 6-БАП. Определены оптимальные параметры освещенности, спектра света и температуры для каждого из исследуемых сортов хризантемы садовой. Наибольшее количество дополнительных побегов получено при интенсивности освещения $56,0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ красным спектром света: 3,54 шт. у сорта 'Kiko' и 1,86 шт. – у сорта 'Ziveno'. Оптимальной температурой для роста и развития микропобегов сорта 'Kiko' была 22°C, для сорта 'Ziveno' этот показатель составил 25°C. Формирование корней у сортов 'Kiko' и 'Ziveno' происходило на среде $\frac{1}{2}$ МС, дополненной 0,5 мг/л ИУК или 0,5 мг/л НУК, соответственно. Все укорененные растения успешно прошли акклиматизацию в условиях *ex vitro*.

Благодарность

Работа выполнена по Госзаданию FNNS-2022-0002 ФГБУН «НБС-ННЦ» на оборудовании УНУ «Научный центр биотехнологии, геномики и депонирования растений» («ФИТОБИОГЕН») ФГБУН «НБС-ННЦ» (Ялта, Россия), рег. номер 669802.

Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. Пособие. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. Методология биотехнологических исследований цветочно-декоративных культур: коллективная монография / под общ. ред. И.В. Митрофановой. – Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2018. – 268 с. DOI: 10.32514/978-5-907118-58-4
3. Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Смыкова Н.В. Оздоровление и размножение *in vitro* перспективных сортов и гибридных форм хризантемы садовой селекции Никитского ботанического сада // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. – 2021. – Вып. 138. – С. 92-100. DOI: 10.36305/0513*1634-138-92-100
4. Смыкова Н.В. Использование метода свободного опыления в селекции крупноцветковых хризантем в Никитском ботаническом саду // Сб. тр. Междунар. научно-практич. конф., посвящ. 75-летию Уральского гос. аграрного университета «Инновационное развитие аграрного производства в современных условиях» (26-27 февраля 2015 г., г. Екатеринбург). – Екатеринбург: УрГАУ, 2015. – С. 512-514.
5. Стецович А.С., Сорокопудова О.А. Адаптация видов и сортов хризантем (*Chrysanthemum* L.) при интродукции на юго-запад Черноземья // Вестник КрасГАУ. – 2010. – № 8. – С. 24-28.
6. Chae S.C. Influence of Auxin Concentration on *in vitro* Rooting of *Chrysanthemum morifolium* Ramat // Biosciences Biotechnology Research Asia. – 2016. – Vol. 13(2). – P. 833-837.
7. Eisa E.A., Tilly-Mándy A., Honfi P., Shala A.Y., Gururani M.A. *Chrysanthemum*: A Comprehensive Review on Recent Developments on In Vitro Regeneration // Biology. – 2022. – Vol. 11.
8. Ghosh S., Naika M.B.N., Nishani S., Shiragur M., Bhat A. Studies on Somatic Embryogenesis in *Chrysanthemum* cv. Marigold Using Root and Leaf as Explants // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. – 2018. – Vol. 7(08). – P. 3965-3971. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.708.409>
9. Gul A. Micropropagation of chrysanthemum: M.Sc. thesis. Department of Botany, University of Peshawar. – 2001.
10. Hodson de Jaramillo E., Forero A., Cancino G., Moreno A.M., Monsalve L.E., Acero W. *In vitro* regeneration of three *Chrysanthemum* (*Dendranthema grandiflora*) varieties “via” organogenesis and somatic embryogenesis // Universitas Scientiarum. – 2008. – Vol. 13 (2). – P. 118-127
11. Jahan M.T., Islam M.R., Shariar Islam S.A.M., Das P., Md M. Islam, Md M. Islam, Kabir M.H., Mamun A.N.K. Clonal propagation of *Chrysanthemum morifolium* ramat using various explants obtained from field grown plants // GSC Biological and Pharmaceutical Sciences. – 2021. – Vol. 16(02). – P. 087-093. DOI: <https://doi.org/10.30574/gscbps.2021.16.2.0231>
12. Kaul V., Miller R.M., Hutchinson J.F., Richards D. Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.) // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1990. – Vol. 21. – P. 21-30.

13. Kazeroonian R., Kalatejari S., Mousavi A., Tohidfar M. Reaction of various explants of a *Chrysanthemum morifolium* cultivar to plant growth regulators in vitro // Iranian Journal of Horticultural Science. – 2018a. – Vol. 48(3). – P. 527-534.
14. Kazeroonian R., Mousavi A., Kalate Jari S., Tohidfar M. Factors Influencing in vitro organogenesis of *Chrysanthemum morifolium* cv. 'Resomee Splendid' // Iranian J Biotech. – 2018b. – Vol. 16(2). DOI: 10.21859/ijb.1454
15. Keresa S., Mihovilovic A., Baric M., Vesna Z.V., Skelin M. The micropropagation of Chrysanthemums via axillary shoot proliferation and highly efficient plant regeneration by somatic embryogenesis // Afr. J. of Biotechnol. – 2012. – Vol. 11(22). – P. 6027-6033. DOI: 10.5897/AJB10.1976
16. Kumar N., Reddy M.P. In vitro plant propagation: a review // Journal of Forest Science. – 2011. – Vol. 27(2). – P. 61-72.
17. Kurilčik A., Dapkūnienė S., Kurilčik G., Duchovskis P., Urbonavičiūtė A., Žilinskaitė S., Žukauskas A. Effect of far-red light on the growth of chrysanthemum plantlets in vitro // Scientific Works of the Institute of Horticulture, Lithuanian Research Centre for Agriculture and Forestry and Lithuanian University of Agriculture. Sodininkystė IR Daržininkystė. – 2011. – Vol. 30(3-4). – P. 103-108.
18. Kurilčik A., Miklušytė-Čanova R., Dapkūnienė S., Žilinskaitė S., Kurilčik G., Tamulaitis G., Duchovskis P., Žukauskas A. In vitro culture of *Chrysanthemum* plantlets using light-emitting diodes // Central European Journal of Biology. – 2008. – Vol. 3(2). – P. 161-167.
19. Mitrofanova O.V., Ivanova N.N., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Brailko V.A., Zhdanova I.V., Mitrofanova I.V. Effect of light intensity on in vitro regeneration in some relict endemic species of the Crimean flora // ActaHortic. – 2021. – Vol. 1324. – P. 27-34. DOI: 10.17660/ActaHortic.2021.1324.4
20. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiologia Plantarum. – 1962. – Vol. 15 (3). – P. 473-497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
21. Naing A.H., Kim C.K., Yun B.J., Jin J.Y., Lim K.B. Primary and secondary somatic embryogenesis in *Chrysanthemum* cv. Euro // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2013. – Vol. 112. – P. 361-368. DOI: 10.1007/s11240-012-0243-5
22. Rout G.R., Das P. Recent trend in biotechnology of *Chrysanthemum*: a critical review // Scientia Horticulturae. – 1997. – Vol. 69. – P. 239-257.
23. Swarna R.J., Yeasmin D., Md Rahman M.M.A.F. (2016) Protocol on direct organogenesis in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. // Int. J. Biosci. – 2016. – Vol. 9(4). – P. 123-137.
24. Vântu S. Organogenesis in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. (Cultivar "Romica") Callus Cultures // Analele Stiintifice ale Universitatii "Al. I. Cuza" din Iași. – 2006. – Vol. 52. – P. 71-76.
25. Wang X., Zeng L., Peng Y., Xi C., Lin D. Studies on Rapid-Micropropagation Technology of Different Chrysanthemum Cultivars // J. Shanghai Jiaotong Univ. Sci. – 2013. – Vol. 31. – P. 19-29.
26. Waseem K., Jilani M.S., Khan M.S. Rapid plant regeneration of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* L.) through shoot tip culture // African Journal of Biotechnology. – 2009. – Vol. 8(9). – P. 1871-1877. DOI:10.4314/AJB.V8I9.60407
27. Waseem K., Jilani M. S., Jaskani M. J., Khan M.S., Kiran M., Khan G.U. Significance of different plant growth regulators on the regeneration of chrysanthemum plantlets (*Dendranthema morifolium* L.) through shoot tip culture // Pak. J. Bot. – 2011. – Vol. 43(4). – P. 1843-1848.

28. Yan K., Du X., Mao B. Production of virus-free chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) by tissue culture techniques // Plant Virology: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. – Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature, 2022. – Vol. 2400. – P. 171-186.

29. 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(1-2). – P. 47-50.

Статья поступила в редакцию 05.05.2023 г.

Ivanova N.N., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Zhdanova I.V., Smykova N.V., Korzina N.V. Clonal micropropagation *in vitro* of garden chrysanthemum // Bull. of the State Nikit. Botan. Gard. – 2023. – № 149. – P. 39-49

Garden chrysanthemum is a well-known and widespread flower culture. The investigated cultivars of the Netherlands breeding Kiko and Ziveno are highly decorative and promising. Their vegetative propagation by cuttings is ineffective, which requires the use of modern biotechnological methods of mass propagation. The ways of *in vitro* morphogenesis of two cultivars of chrysanthemum have been studied. The optimal concentrations of plant growth regulators 6-benzylaminopurine and 6-furfurylaminopurine in the MS culture medium were determined, which made it possible to obtain normally developed adventitious microshoots. A high frequency of adventitious shoot formation on the medium with 1.0 mg/l 6-BAP was noted. The number of adventitious shoots was 4.9 ± 0.53 and 2.70 ± 0.37 per explant after 30 days of cultivation in the cultivars Kiko and Ziveno, respectively. The optimal importance of light intensity, light quality and temperature during *in vitro* cultivation have been established. A different morphogenetic response of the studied cultivars to the growing conditions is shown. The culture medium for *in vitro* rhizogenesis of two cultivars of garden chrysanthemum has been optimized. It was found that the best rooting of microshoots occurred on $\frac{1}{2}$ MS medium supplemented with 0.5 mg/l indolyl-3-acetic acid or 0.5 mg/l α -naphthylacetic acid. Rooted plants are adapted in *ex vitro* conditions.

Key words: *Chrysanthemum* $\times$ *morifolium* Ramat.; *in vitro* morphogenesis; explant; plant growth regulators; light intensity; temperature