

УДК: 631.147

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ХРИЗАНТЕМ

ГРАНДА РОБЕРТО

(Кафедра с.-х. биотехнологии)

Разработана лабораторная технология клонального микроразмножения хризантем российской селекции с использованием различных первичных эксплантов. Методом ПЦР-анализа установлено наличие вируса *Chrysanthemum Virus B* в нижних ярусах и его отсутствие в верхних ярусах пробирочных растений.

Ключевые слова: хризантемы, культура ткани, морфогенез, экспланты, питательные среды, каллусогенез, БАП, ИУК, 2,4-Д, ПЦР-анализ, вирус

При выращивании хризантем часто возникают проблемы, связанные с физиологией растений. Например, культивирование растений в условиях ограниченного пространства питания часто приводит к угнетению роста, нарушению образования бутонов и развитию дегенеративных цветков, поражению листьев. Данные физиологические отклонения могут привести к гибели растения [2].

Вегетативное размножение хризантем обуславливает существенное накопление в их искусственных популяциях различных заболеваний. Наибольший урон наносят в этом случае вирусные заболевания, которые не поддаются химическому контролю. Наибольшее распространение в растениях хризантем получил вирус *Chrysanthemum, Virus B* (CVB) (РНК-содержащий вирус длиной около 670 н.п.) [7]. Распространение вирусов диктует необходимость постоянно поддерживать высокий уровень агрофона, а также вести активную селекционную работу, позволяющую проводить быструю смену сортов. Частично эта проблема может решаться за счет размножения

безвирусного материала в культуре тканей и клеток растений *in vitro* методом клонального микроразмножения [6], в основе которого лежит уникальная способность растительной клетки реализовывать присущую ей тотипотентность. Сортовое многообразие хризантем в значительной степени проявляется на уровне тотипотентности клеток и регенерационном потенциале, что вызывает необходимость дифференцированного подхода к применению и совершенствованию технологий клонального микроразмножения для каждого изучаемого генотипа.

Материалы и методы

Объектом исследования служили сорта хризантем отечественной селекции — Снежка, Камила, Белый Снег, Вдохновение и Октябрь. В качестве первичного экспланта использовали сегменты листовых пластинок, побегов, черешков и лепестков. Экспланты стерилизовали 0,1%-м раствором сулемы с подбором оптимального времени их обеззараживания и многократным промыванием стерильной дистиллированной водой. Оптимальное время

Научный руководитель — д. б. н. Е.А. Калашникова.

стерилизации определяли по жизнеспособности первичных эксплантов и зараженности их фитопатогенами.

В работе придерживались принятых на кафедре сельскохозяйственной биотехнологии РГАУ-МСХА имени КА. Тимирязева методик приготовления и стерилизации питательных сред, инструментов и оборудования [1].

При культивировании изолированных эксплантов в условиях *in vitro* использовали минеральную основу питательной среды Мурасига и Скуга (МС) [5], в сочетании с агаром и сахарозой. В качестве регуляторов роста в питательные среды добавляли БАП, ИУК и 2,4-Д в различных концентрациях и комбинациях.

Для проведения ПЦР-анализа использовали праймеры из компании Синтол (CVB-CP1-F, CVB-CP1-R; CVB-CP2-F, CVB-CP2-R) и МГУ (CVB-CP-CM, CVB-CP-CP), которые были выбраны с таким расчетом, чтобы при ПЦР амплифицировалась высококонсервативная последовательность внутри гена капсидного белка (СР). Предполагается, что такая конструкция праймеров должна обеспечить выявление практически любого изолята CVB независимо от его штаммовой принадлежности.

Результаты и их обсуждение

Исследования показали, что различный гормональный состав питательной среды приводит к изменению морфофизиологических процессов, которые выражаются: 1 — в формировании каллусной ткани из первичного экспланта с последующей регенерацией растений; 2 — в регенерации растений непосредственно из клеток первичного экспланта; 3 — в индукции развития существующих в растении меристем.

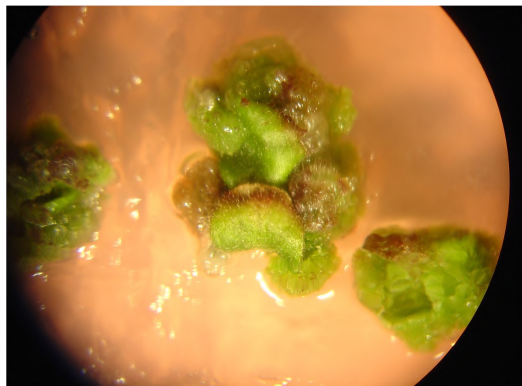
Экспериментально установлено, что культивирование изолированных листовых пластинок, черешков и сегментов междоузлий на питательной среде, содержащей ИУК в различных концент-

рациях, приводит к образованию плотной каллусной ткани зеленеющей на свету (рис. 1, А). Добавление в питательную среду 2,4-Д стимулировало процесс ризогенеза (рис. 1, Б), а присутствие комплекса гормонов (БАП 1 мг/л и ИУК 1 мг/л) стимулировало прямую регенерацию растений из клеток первичного экспланта (рис. 1, В). Последующее культивирование сформировавшихся микропобегов на питательной среде аналогичного состава приводило к формированию микрорастений (рис. 1, Г), у которых не были отмечены изменения в морфологии листа и стебля. Такие растения легко адаптировались к условиям *in vivo*. Применение метода индукции образования адвентивных почек непосредственно на первичном экспланте позволяет существенно повысить коэффициент размножения и сохранять генетические особенности растения-донора.

Культивирование лепестков на питательных средах, содержащих различные концентрации БАП и ИУК, приводило к образованию рыхлой каллусной ткани, реже плотной, в которой не происходила дефференциация меристематических очагов, дающих начало развитию побегов. Однако в вариантах, где ИУК присутствовала без сочетания с БАП, наблюдали процесс ризогенеза.

Проведенные исследования по тестированию пробирочных растений хризантем на наличие вируса *Chrysanthemum Virus B* с применением ПЦР-анализа показали его присутствие в трех исследуемых сортах. Причем экспериментально установлено, что наличие вируса отмечено лишь в эксплантах, изолированных с нижних ярусов растений, в то время как в верхней части пробирочных растений он обнаружен не был (рис. 2).

Таким образом, в результате исследований разработана лабораторная технология клонального микроразмножения отечественных сортов хризантем



А



Б



В



Г

Рис. 1. Морфогенетическая активность изолированных первичных эксплантов:

А — каллусогенез на изолированных сегментах листовых пластинок (присутствие в питательной среде ИУК 1 мг/л), Б — индукция ризогенеза на сегментах междоузлий побега (присутствие в питательной среде 2,4-Д), В — индукция образования адвентивных почек на листовых пластинках (присутствие в питательной среде БАП 1 мг/л и ИУК 1 мг/л), Г — активация развития существующих меристем, формирование микропобегов (присутствие в питательной среде БАП 1 мг/л, ИУК 0,5 мг/л)

в условиях *in vitro*, которая включает 3 этапа: культивирование сегментов стебля с одной или двумя пазушными почками на среде, содержащей БАП 1 мг/л и ИУК 0,5 мг/л, приводящее к активации роста существующих меристем и формированию побегов; микрочеренкование с одновременным образованием корней; адаптация пророщен-

ных растений к почвенным условиям выращивания.

Клональное микроразмножение растений — сложный многофакторный морфофизиологический процесс, состоящий из двух принципиально разных этапов, проходящих в разных условиях — *in vitro* и *in vivo*, базирующихся на процессах онтогенеза, мор-

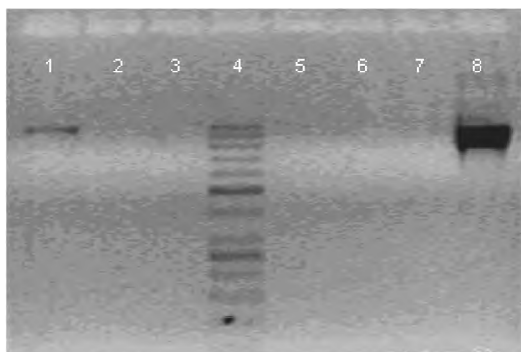
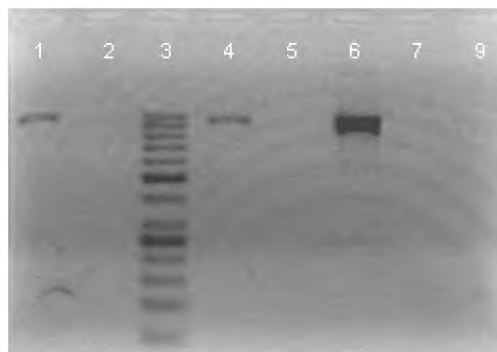


Рис. 2. Электрофореграммы результатов ПЦР (маркер 50-1000bp).

- А. 1 — сорт Снежка (нижний ярус), 2 — сорт Снежка (верхний ярус), 3 — маркер мол. веса 50bp+1Кб, 4 — сорт Камила (нижний ярус), 5 — сорт Камила (верхний ярус), 6 — положительный контроль, 7 — отрицательный контроль; Б. 1 — сорт Белый Снег (нижний ярус), 2 — сорт Белый Снег (верхний ярус), 3 — сорт Вдохновение (нижний ярус), 4 — маркер мол. веса 50bp+1 Кб, 5 — сорт Вдохновение (верхний ярус), 6 — сорт Октябрь (нижний ярус), 7 — сорт Октябрь (верхний ярус), 8 — положительный контроль,

фогенеза и регенерации растений в условиях *in vitro* и на структурно-функциональной адаптации пробирочных растений в условиях *in vivo*. Экспериментально установлено, что реализация морфогенетического потенциала хризантем зависит от генотипа, соответствующей оптимизации состава питательной среды, типа первичного экспланта, его полярности и времени изоляции с растения-донора, а также условий культивирования.

Библиографический список

1. Калашиникова Е.А., Кониева Е.З., Миронова О.Ю. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. М.: КолосС, 2006. — 2. Миронова О.Ю. Микрোকлональное размножение хризантем для промышленного цветоводства // Доклады ТСХА. Вып. 275. М.: МСХА, 2003. — 3.

4. Brunt A Chrysanthemum B carlavirus. In: Viruses of Plants Kescription and Lists from the VIKE Katabase. CAB international, 1995. P. 398-400. — 4. Hill M.F., Giles R.J., Moran J.R., Hepworth G. The incidence of chrysanthemum stunt viroid, chrysanthemum B carlavirus, tomato aspermy cucumovirus and tomato spotted wilt tospovirus in Australian chrysanthemum crops. Australian Plant Pathot, 1996, 25(3). P. 174-178. — 5. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassaya with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum, 1962. Vol 15. N 3. P. 473-497. — 6. Rout G.R., Kas P. Recent trends in the biotechnology of Chrysanthemum: a critical review. Sci Horti, 1997, 69. P. 239-56. — 7. Wetter C., Milne R.G. Carlaviruses In Plant Virus Infections: Comparative diagnosis. Edited by Kurstak E. Amsterdam-New York-Kxford: Elsevier, North Holland, Biomedical Press, 1981. P. 695-730.

Рецензент — д. б. н. А.А. Соловьев

SUMMARY

Laboratory technology of chrysanthemums clonal micropropagation *in vitro* was developed, various primary explants used. Existence of Chrysanthemum Virus B in lower layers was discovered and the absence of the virus was discovered in upper layers of test-tube plants by PSR method.