

УДК 581.143.6:582.998.2

## Клональное микроразмножение *Chrysanthemum leiophyllum* (Asteraceae)

Е. В. Курицкая, А. И. Недолужко, Э. В. Вржосек, Е. В. Болтенков

Ботанический сад-институт ДВО РАН, ул. Маковского 142, Владивосток, 690024, Россия  
E-mail: [akvilegia-praim@mail.ru](mailto:akvilegia-praim@mail.ru)

**Ключевые слова:** *Chrysanthemum leiophyllum*, культура *in vitro*, органогенез, регуляторы роста, число хромосом.

**Аннотация.** Восточноазиатский вид *Chrysanthemum leiophyllum* является источником адаптивных признаков в селекции *Ch. × morifolium*. Исследовали особенности введения в культуру *in vitro* и клонального микроразмножения *Chrysanthemum leiophyllum*. В качестве эксплантов использовали части побега с пазушными почками. Разработан способ стерилизации побегов, который обеспечивает получение жизнеспособных эксплантов. При культивировании на среде Мурасиге-Скуга (МС), дополненной 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 30 г/л сахарозы, формировались укороченные и витрифицированные побеги, в базальной части которых развивалась каллусная ткань. Уменьшение содержания БАП до 0,2 мг/л способствовало росту побегов. Снижение концентрации сахарозы в два раза приводило к увеличению коэффициента размножения *Ch. leiophyllum* до 10,3, а при снижении концентрации макросолей коэффициент размножения достигал 11,7. Оптимальной для размножения побегов является среда с половинным содержанием макросолей в сочетании с 0,2 мг/л БАП. Интенсивное развитие корней отмечено на МС-среде с половинным содержанием макросолей в присутствии 0,5 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК) и 30 г/л сахарозы. На развитие корней в большей степени влияли регуляторы роста, оптимальным регулятором роста на стадии укоренения является ИУК. Эффективность адаптации растений к почвенным условиям составила 98 %. Полученные *in vitro* растения нормально развивались, к концу первого года в открытом грунте образовали приземные розетки листьев, а на второй год вступили в генеративную фазу. Число хромосом у полученных *in vitro* растений соответствовало материнскому растению  $2n = 36$ .

## Micropropagation of *Chrysanthemum leiophyllum* (Asteraceae)

E. V. Kuritskaya, A. I. Nedoluzhko, E. V. Vrzhosek, E. V. Boltenkov

Botanical Garden-Institute, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences,  
ul. Makovskogo 142, Vladivostok, 690024, Russia

**Key words:** *Chrysanthemum leiophyllum*, *in vitro* culture, organogenesis, phytohormones, chromosome number.

**Summary.** The East Asian species *Chrysanthemum leiophyllum* is a source of adaptive traits in the breeding of *Ch. × morifolium*. The specifics of introduction of *Ch. leiophyllum* into an *in vitro* culture and its micropropagation were studied. Stem segments with axillary buds were used as explants. A technique for sterilization of stems to obtain viable explants was developed. Shorter and vitrified shoots, with the callus tissue developing in their basal part, formed on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 0,5 mg/L 6-benzylaminopurine (BAP) and 30 g/L sucrose. A decrease in the BAP level to 0.2 mg/L promoted shoot growth. A two-fold decrease in the sucrose concentration raised the multiplication coefficient of *Ch. leiophyllum* shoots to 10,3, while a two-fold decrease in the macro-salts concentration raised the multiplication coefficient to 11.7. It was found that concentration of macro-salts has an effect on shoot development. The medium with half-strength MS macrosalts in combination with 0.2 mg/L BAP was optimal for shoot propagation. Adventitious buds formed in the basal part of shoots. Roots developed intensively in the medium with half-strength MS macrosalts and in the presence of 0,5 mg/L indoleacetic acid (IAA) and 30 g/L sucrose. Growth of roots was influenced mostly by plant growth regulators (PGR); the optimal PGR at the rooting stage was IAA. The efficiency of adaptation of plants to soil conditions constituted 98 %. The plants obtained *in vitro* and

transplanted to soil grew normally. The ground-hugging rosettes of leaves developed by the end of the first year on the open soil; in the second year, the plants entered the generative phase. The chromosome number was  $2n = 36$  both in the *in vitro* obtained plants and in the original plant.

### Введение

Сорта хризантемы садовой (*Chrysanthemum × morifolium* (Ramat.) Hemsl.), полученные в условиях мягкого климата Восточной Азии, характеризуются продолжительным и обильным цветением. На юге Дальнего Востока России такие сорта не зимуют, восприимчивы к автохтонной микобиоте, для некоторых сортов характерно позднее цветение. Основой создания устойчивых сортов является привлечение дикорастущих видов рода *Chrysanthemum* L. флоры Восточной Азии в межвидовую гибридизацию (Nedoluzhko, 2010).

Хризантема гладколистная (*Chrysanthemum leiophyllum* Nakai) – эндемичный вид, произрастает на Корейском полуострове. Это многолетнее травянистое растение достигает в культуре 80 см высоты (рис. 1к). Прикорневые листья *Ch. leiophyllum* почковидные или широкояйцевидные с длинными черешками; стеблевые листья мелкие, яйцевидные, трех- или перистолопастные с укороченным черешком. Многочисленные корзинки до 4 см в диаметре обладают ароматом, собраны в рыхлые щитковидные соцветия; ложноязычковые цветки ярко-розовые. *Ch. leiophyllum* обладает ценными селекционными признаками: совместим при гибридизации с сортами *Ch. × morifolium*, неприхотлив к условиям произрастания, устойчив к белой ржавчине *Puccinia horiana* Henn., рано цветет.

Из природы нами было получено одно растение *Ch. leiophyllum*, которое планировали использовать в селекции. В ходе работы мы столкнулись с проблемой сохранения и вегетативного размножения этого растения. Современные технологии клеточной и тканевой культуры превосходят традиционные способы размножения растений по скорости и объему получаемого материала (Rout et al., 2006). При размножении сортов *Ch. × morifolium* применяют метод культуры органов и тканей растений (Hill, 1968; Stewart, Dermen, 1970). В качестве эксплантов использовали листья и стебли (Kaul et al., 1990; Lu et al., 1990), почки и органы цветка (Bush et al., 1976; Chakrabarty et al., 1999). Показано, что на рост и развитие побегов влияют регуляторы роста, содержание углеводов и уровень pH (Karim et al., 2003). Сообщалось о клональном микроразмножении дикорастущих видов рода

*Chrysanthemum* (Lee et al., 2004). Литературные данные по клональному микроразмножению *Ch. leiophyllum* нам не известны.

Целью настоящего исследования является введение *Ch. leiophyllum* в культуру *in vitro* и разработка технологии клонального микроразмножения.

### Материалы и методы

Растение *Chrysanthemum leiophyllum* Nakai было собрано в 2014 г. Р. В. Дудкиным на Корейском полуострове (37°27'35,19» с. ш. 128°27'36,79» в. д.) и высажено в экспериментальную теплицу на территории БСИ ДВО РАН. Для получения асептической культуры проводили многоступенчатую стерилизацию побегов водными растворами: мыльным (15 мин), 0,25 % «Ридомила» (30 мин), 0,5 % гипохлорита натрия (5 мин) и 0,2 % диоксида (10 мин). После каждого стерилизующего раствора побеги трижды промывали дистиллированной водой. В качестве эксплантов использовали части побега (0,5–1,0 см длиной) с пазушными почками. Экспланты высаживали на среду Мурасиге и Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962). Питательные среды различались по содержанию макросолей, сахарозы и регуляторов роста: 6-бензиламинопурин (БАП), индолилуксусная (ИУК) и индолилмасляная (ИМК) кислота (табл. 1). На этапе культивирования длина фотопериода составляла 16 часов. Культивируемые *in vitro* растения инкубировали при температуре 22–24 °С и относительной влажности воздуха 70 %. Продолжительность первого пассажа составляла 45 сут., последующих – 30–35 сут. Эффективность развития побегов оценивали по их длине и коэффициенту размножения, который рассчитывали по двум пассажам по формуле  $K = a / b$ , где  $a$  – количество вновь образованных побегов,  $b$  – количество субкультивированных побегов. В каждом варианте опыта использовали 10 эксплантов, опыты проводили в двух повторностях. Морфогенез оценивали через 30 сут. культивирования. В таблицах представлены среднеарифметические значения и их стандартные отклонения.

Полученные *in vitro* растения высаживали в закрытые контейнеры, заполненные смесью почвы и вермикулита (в соотношении 1 : 1) и инкубировали при температуре 22–24 °С и фотопери-

оде 16 часов. Растения обрабатывали фунгицидом «Фитолавин» два раза в неделю.

Число хромосом определяли в меристеме корней вегетирующих растений с использованием методики давленных препаратов (Abramova,

1988). Анализировали материнское растение и десять растений, полученных *in vitro* путем прямого органогенеза (случайная выборка). Апикальную часть молодых корешков обрабатывали 0,002 М раствором 8-гидроксихинолина.

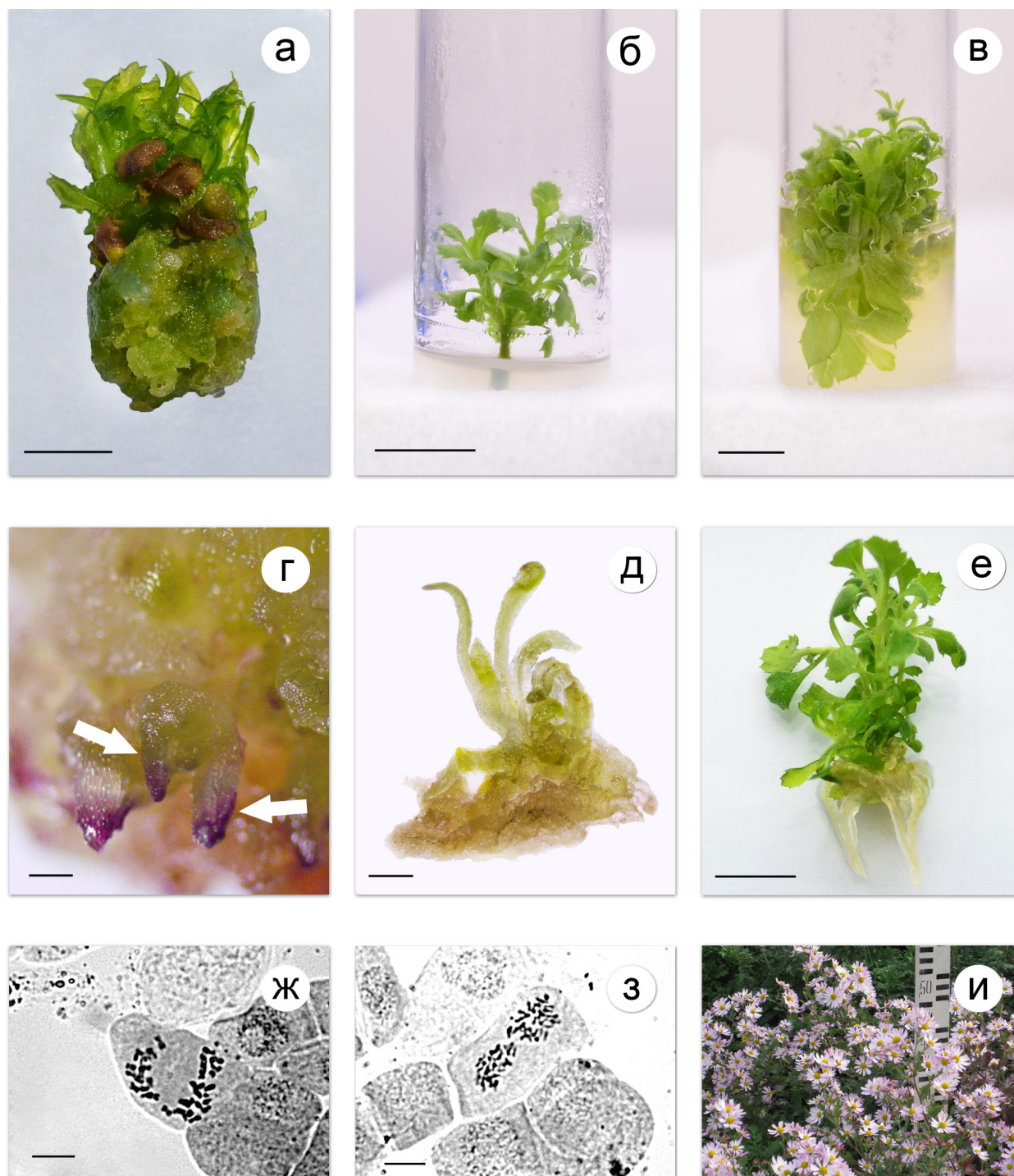


Рис. 1. Этапы клонального микроразмножения *Chrysanthemum leiophyllum*: а – развитие побегов и калусной ткани на МС-среде с добавлением 0,5 мг/л БАП (линейка 1 см); б – развитие побегов на МС-среде с половинным содержанием макроэлементов и 0,2 мг/л БАП (линейка 1 см); в – кластеры побегов (линейка 1 см); г – формирование адвентивных почек в основании побега (стрелками показаны примордиальные листья, линейка 0,5 мм); д – развитие побега из адвентивной почки (линейка 0,5 мм); е – развитие корней на МС-среде, содержащей 0,5 мг/л ИУК (линейка 1 см); ж – кариотип исходного растения ( $2n = 36$ , линейка 10 мкм); з – кариотип полученного *in vitro* растения ( $2n = 36$ , линейка 10 мкм); и – полученные *in vitro* растения в открытом грунте.

Таблица 1

## Варианты питательных сред

Вариант опыта	Минеральный состав	Содержание регуляторов роста, мг/л			Сахароза, г/л
		БАП	ИУК	ИМК	
1	МС	0,2	—	—	15
2	МС	0,2	—	—	30
3	½ МС	0,2	—	—	15
4	½ МС	0,2	—	—	30
5	½ МС	—	0,5	—	30
6	МС	—	0,5	—	30
7	½ МС	—	—	0,5	30
8	МС	—	—	0,5	30

В качестве фиксатора использовали смесь ледяной уксусной кислоты и 96 %-го спирта (в соотношении 1 : 3) и окрашивали ацетокармином. Препараты исследовали с помощью светового микроскопа Axiolab оснащенного монохромной CCD-камерой AxioCam MRc (Carl Zeiss, Германия). Органогенез наблюдали с помощью стереомикроскопа Stemi 2000 оснащенного цветной CCD-камерой AxioCam ICc3 (Carl Zeiss, Германия).

**Результаты и их обсуждение**

На этапе введения в культуру *in vitro* *Chrysanthemum leiophyllum* добивались получения стерильных жизнеспособных эксплантов. Протоколы стерилизации отличались по времени экспозиции побегов в водных растворах нескольких стерилизующих агентов. Установлен оптимальный способ стерилизации (описан в предыдущем разделе), эффективность которого составила 67 %. Экспланты помещали на МС-среду, дополненную 30 г/л сахарозы и 0,5 мг/л БАП. Развитие побегов из пазушных почек начиналось через 8–10 сут. На 45-е сутки среднее число побегов на один эксплант составляло 10 шт. Полученные на этой питательной среде побеги были укорочены и витрифицированы, в базальной части эксплантов активно формировался рыхлый каллус (рис. 1а). Субкультивирование побегов на МС-среду с уменьшенным содержанием БАП до 0,2 мг/л способствовало их удлинению, а также полному или частичному снижению каллусогенеза (рис. 1б).

Ранее было показано (Karim et al., 2003), что на этапе индукции побегов *Ch. × morifolium* оптимальной концентрацией сахарозы в питательной среде является 30 г/л. В ходе нашего эксперимента установлено, что влияние сахарозы зависело от концентрации макроэлементов (табл. 2). Минимальное число побегов отмечено на стан-

дартной МС-среде с 30 г/л сахарозы. Уменьшение содержания сахарозы в среде способствовало увеличению числа побегов в два раза, однако при этом интенсивнее развивалась рыхлая неморфогенная каллусная ткань. Исходя из этого, можно предположить, что уменьшение содержания сахарозы в МС-среде приводит к увеличению коэффициента размножения *Ch. leiophyllum*. Однако в большей степени на морфогенез побегов влияла концентрация макроэлементов.

На МС-среде с половинным содержанием макроэлементов частота развития побегов возрастала, и увеличивалась их длина (табл. 2). При этом формировались кластеры побегов (рис. 1в), снижалась их витрификация, уменьшалась частота каллусогенеза. Наибольший коэффициент размножения *Ch. leiophyllum* отмечен на МС-среде с половинным содержанием макроэлементов, 30 г/л сахарозы и 0,2 мг/л БАП.

В нашем эксперименте побеги развивались из пазушных и адвентивных почек, которые закладывались в базальной части побегов (рис. 1г, д). В культуре *in vitro* хризантем адвентивные почки формируются путем прямого и непрямого органогенеза. Так, было инициировано развитие адвентивных почек в базальной части ложноязычковых цветков *Ch. × morifolium* (Chakrabarty et al., 2000). Этот способ регенерации побегов используют для получения соматоклональных вариантов хризантем (Khalid et al., 1989). Соматоклональная изменчивость связана с влиянием определенных регуляторов роста, либо их высоких концентраций, а также с индукцией органогенеза или соматического эмбриогенеза в каллусных культурах (Karp, 1995). В представленной работе эти эффекты были исключены в связи с необходимостью получения клонов.

На следующем этапе кластеры побегов разделяли на отдельные побеги и субкультивировали на среды для укоренения. Изучали влияние со-

Таблица 2

Развитие и рост побегов *Chrysanthemum leiophyllum* в культуре *in vitro*

Питательная среда	Содержание сахарозы, г/л	Длина побегов, см	Коэффициент размножения	Витрификация, %	Каллусо-генез %
МС	15	0,4 ± 0,3	10,3	35	50
МС	30	0,6 ± 0,3	7,3	35	35
½ МС	15	0,9 ± 0,4	8,3	30	10
½ МС	30	0,8 ± 0,5	11,7	20	20

Примечание. Анализировали побеги, сформированные из пазушных почек. Во всех вариантах опыт использовали 0,2 мг/л БАП.

Таблица 3

Характеристика растений *Chrysanthemum leiophyllum* на этапе укоренения *in vitro*

Питательная среда	Длина побегов, см	Число корней, шт.	Длина корней, см	Витрификация, %	Каллусогенез, %
½ МС + 0,5 ИУК	1,7 ± 0,7	8,4 ± 3,0	1,7 ± 0,7	20	10
МС + 0,5 ИУК	1,7 ± 0,8	5,7 ± 2,5	1,0 ± 0,5	10	15
½ МС + 0,5 ИМК	1,4 ± 0,5	3,0 ± 1,7	0,8 ± 0,6	–	30
МС + 0,5 ИМК	1,4 ± 0,5	7,0 ± 4,6	1,0 ± 0,3	–	10

Примечание. Концентрация сахарозы в питательных средах составляла 30 г/л.

держания макросолей и ауксинов на развитие корней, а также определяли длину побегов (табл. 3). На питательной среде с половинным содержанием макросолей и 0,5 мг/л ИМК отмечено минимальное число корней. Наиболее эффективно корни развивались на среде с половинным содержанием макросолей в присутствии 0,5 мг/л ИУК (рис. 1е). Исходя из этого, можно сделать вывод о том, что на частоту корнеобразования преимущественно оказывают влияние регуляторы роста, а не концентрация макросолей в питательной среде. Оптимальным для укоренения *Ch. leiophyllum* является ИУК.

Полученные *in vitro* растения высаживали в закрытые контейнеры, заполненные смесью из почвы и вермикулита. На первых этапах адаптации поддерживали 100 % влажность воздуха, в дальнейшем контейнеры проветривали. Эффективность адаптации растений составила 98 %. Через месяц полученные растения высажены в открытый грунт. К концу первого года растения образовали приземные розетки листьев, успеш-

но зимовали, и на второй год вступили в генеративную фазу (рис. 1и).

При проведении цитогенетического анализа было установлено, что полученные *in vitro* растения не отличались по числу хромосом от материнского растения. Кариотип растений состоял из 36 хромосом (рис. 1ж, з). Полиплоидных и анеуплоидных растений выявлено не было.

Таким образом, предложен способ клонального микроразмножения *Chrysanthemum leiophyllum* из эксплантов побега. Кариотип растений, полученных путем прямого органогенеза в культуре *in vitro* полностью соответствовал таковому материнского растения. Разработанный способ может быть рекомендован для получения посадочного материала с целью его дальнейшего использования для гибридизации с сортами *Ch. × morifolium*.

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность Р. В. Дудкину за предоставленный материал *Chrysanthemum leiophyllum*.

## REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

*Abramova L. I.* 1988. *Opređenje čísla hromosom i opisane ih morfologije v meristeme i v zernah kul'turnyh rastenij: Metodicheskie ukazaniya* [Determination of chromosome number and description of their morphology in the meristem and grains of cultivated plants: Guidelines]. Leningrad, 62 p. [In Russian]. (*Абрамова Л. И.* Определение числа хромосом и описание их морфологии в меристеме и в зернах культурных растений: Методические указания. Л.: ВИР, 1988. 62 с.).

- Bush S. R., Earle E. D., Langhans R. W.** 1976. Plantlets from petal segments, petal epidermis, and shoot tips of the periclinal chimera, *Chrysanthemum morifolium* 'Indianapolis'. *Amer. J. Bot.* 63(6): 729–737. DOI: 10.2307/2442032
- Chakrabarty D., Mandal A. K. A., Datta S. K.** 1999. Management of chimera through direct shoot regeneration from florets of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 74(3): 293–296. DOI: 10.1080/14620316.1999.11511111
- Chakrabarty D., Mandal A. K. A., Datta S. K.** 2000. SEM and light microscopic studies on direct shoot regeneration from ray florets of *Chrysanthemum*. *Israel J. Plant Sci.* 48(2): 105–107. DOI: 10.1560/B6WM-2565-2BVY-P3W9
- Hill G. P.** 1968. Shoot formation in tissue cultures of *Chrysanthemum* 'Bronze Pride'. *Physiol. Plant.* 21(2): 386–389. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1968.tb07262.x
- Karim M. Z., Amin M. N., Azad M. A. K., Begum F., Rahman M. M., Ahmad S., Alam R.** 2003. *In vitro* shoot multiplication of *Chrysanthemum morifolium* as affected by sucrose, agar and pH. *Biotechnology* 2(2): 115–120. DOI: 10.3923/biotech.2003.115.120
- Karp A.** 1995. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica* 85(1): 295–302. DOI 10.1007/BF00023959
- Kaul V., Miller R. M., Hutchinson J. F., Richards D.** 1990. Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 21(1): 21–30. DOI: 10.1007/BF00034487
- Khalid N., Davey M. R., Power J. B.** 1989. An assessment of somaclonal variation in *Chrysanthemum morifolium*: the generation of plants of potential commercial value. *Sci. Hort.* 38(3–4): 287–294. DOI: 10.1016/0304-4238(89)90076-9
- Lee S. M., Lee C. H., Kim K. S.** 2004. Multiplication of *Dendranthema zawadskii* ssp. *latilobum* var. *leiophyllum* through multiple shoot induction from rhizome-derived shoot tip culture. *J. Korean Soc. Hort. Sci.* 45(1): 43–48.
- Lu C. Y., Nugent G., Wardley T.** 1990. Efficient, direct plant regeneration from stem segments of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat. cv. Royal Purple). *Plant Cell Rep.* 8(12): 733–736. DOI: 10.1007/BF00272106.
- Murashige T., Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15(3): 473–497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nedoluzhko A. I.** 2010. Prospects of using wild relatives in breeding of *Chrysanthemum hortorum*. *Sibirskiy Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki* 11: 43–50 [In Russian]. (**Недолужко А. И.** Перспективы использования диких родичей в адаптивной селекции хризантемы садовой // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки, 2010. № 11. С. 43–50).
- Rout G. R., Mohapatra A., Jain S. M.** 2006. Tissue culture of ornamental pot plants: a critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnol. Adv.* 24(6): 531–560. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.05.001
- Stewart R. N., Dermen H.** 1970. Somatic genetic analysis of the apical layers of chimeral sports in *Chrysanthemum* by experimental production of adventitious shoots. *Amer. J. Bot.* 57(9): 1061–1071. DOI: 10.2307/2441272.