

УДК 635.9:58.083:57.085.2

## ПРИМЕНЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ В ОЗДОРОВЛЕНИИ РАСТЕНИЙ И РАЗМНОЖЕНИИ БЕЗВИРУСНОГО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ПЕРСПЕКТИВНЫХ ЦВЕТОЧНО-ДЕКОРАТИВНЫХ КУЛЬТУР

О.В.МИТРОФАНОВА, И.В. МИТРОФАНОВА,  
Н.П. ЛЕСНИКОВА-СЕДОШЕНКО, Н.Н. ИВАНОВА

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

В статье рассматриваются теоретические и практические вопросы оздоровления растений от вирусов и клонального микроразмножения безвирусного посадочного материала хризантемы, гвоздики, цимбидиума, антуриума Андрэ, розы, лилии, гиацинта, гиппеаструма. Предложена модель системы освобождения растений от вирусов.

**Ключевые слова:** *цветочно-декоративные культуры, вирусы, оздоровление, клональное микроразмножение, безвирусный материал, in vitro.*

### Введение

Уровень развития цветоводства является отражением культурных и эстетических потребностей общества. Спрос на живые цветы в настоящее время значительно опережает предложения производства, который возможно было бы удовлетворить на имеющихся площадях, без сокращения их под сельхозугодьями на основе более интенсивного хозяйствования. Сдерживающим фактором являются значительные потери цветоческой продукции от болезней, среди которых вирусные занимают наибольший удельный вес. Они поражают надземную часть растения, сохраняются в луковицах, клубнелуковицах и корневищах, являясь постоянным источником инфекции. Вирусы быстро накапливаются и распространяются в цветочных растениях. Степень поражаемости цветочных культур и проявления заболевания не постоянна и может усиливаться или ослабляться в зависимости от экологии вирусов и растения-хозяина.

Специфика экологии вирусов затрудняет борьбу с ними из-за облигатности внутриклеточного паразитизма. Их репродукция тесно связана с метаболизмом клетки растения-хозяина [4, 8, 12], и это – основное препятствие для прямого подавления жизнедеятельности возбудителей вирусных заболеваний растений.

В литературе высказываются различные мнения о возможности освобождения растений от вирусов путем вычленения апикальных меристем и их культивирования *in vitro*. Однако широкое внедрение только одного этого метода в практику промышленного цветоводства, являющегося, в сущности, разновидностью метода вегетативного размножения, привело бы к обратному по отношению к ожидаемому результату, то есть к более ускоренному и массовому распространению патогенных вирусов в зараженных культурах: хризантемы, гвоздики, цимбидиума, антуриума Андрэ, розы, лилии, гиацинта, гиппеаструма и др.

В связи с этим наблюдается рост числа публикаций, критически оценивающих указанный метод, как единственный способ радикального решения проблемы борьбы с вирусами, и все большее число исследователей высказывается за интегрированный подход к этой важной проблеме, используя современные достижения биотехнологии и вирусологии [11, 19]. Углубленный анализ сложных взаимоотношений между патогеном и хозяином, происходящих внутри биологических систем, позволяет по-новому их

оценить и найти более надежные пути освобождения растений от вирусов и разработать приемы перевода цветоводства на безвирусную основу.

Перевод цветоводства на безвирусную основу диктуется также ужесточением правил международной торговли и обмена только безвирусным посадочным материалом культурных растений по специальным сертификатам. Поэтому разработка биотехнологии гарантировано безвирусного исходного материала обеспечит значительный рост его качества, повысит экономическую рентабельность и интенсивность отрасли, а, следовательно, позволит более полно удовлетворить потребность населения в цветочной продукции вне зависимости от времени года.

В предлагаемой публикации обобщаются теоретические и практические предпосылки создания безвирусного цветоводства. В отличие от ранее опубликованных статей по вирусам цветочных культур и некоторым методам оздоровления растений [17, 20, 57], данная статья посвящена разработке биотехнологий получения безвирусного посадочного материала экономически важных цветочно-декоративных культур.

Цель настоящей работы – на основе сравнительного изучения методов оздоровления растений от вирусов разработать экологически чистые биотехнологии получения и клонального микроразмножения безвирусного посадочного материала ряда перспективных цветочно-декоративных культур.

#### Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили здоровые и пораженные вирусами растения хризантемы (*Chrysanthemum x hortorum* Bailey), гвоздики (*Dianthus caryophyllus* L.), цимбидиума (*Cymbidium hybridum*), антуриума Андре (*Anthurium andreanum* Lind.), розы (*Rosa* L.), лилии (*Lilium* L.), гиацинта (*Hyacinthus* Taurn.), гиппеаструма (*Hippeastrum hybridum*) и других садовых культур, а также их органы и ткани.

В экспериментальной части работы использованы как общепринятые методы вирусологических исследований и биотехнологии, так и разработанные или модифицированные применительно к конкретным требованиям и целям опытов.

Идентификация вирусов и тестирование растений на вирусы проводилась в соответствии с общепринятыми протоколами на стандартном наборе растений-индикаторов [22, 44], серологически [14, 22, 35, 67] и с помощью электронной микроскопии [31]. Тестирование и ретестирование на вирусы исходного и оздоровленного посадочного материала выполняли, используя растения-индикаторы (*Chenopodium quinoa* Willd., *Datura stramonium* L., *Nicotiana tabacum* L. и др.), метод иммуноферментного анализа (ИФА).

Для изучения локализации вирусов в апикальных меристемах и в протокормах (цимбидиум) фрагменты исследуемой ткани фиксировали в 2,5-5%-ном глютаральдегиде, приготовленном на 0,2М какодилатном буфере (pH 7,2), содержащем 0,05М CaCl<sub>2</sub>, в течение двух часов при температуре 5°C. После 4-кратной промывки в том же буфере образцы фиксировали в 1%-ном осмиевом фиксаторе. Обезвоженные в спиртах кусочки ткани заливали в эпоны. Срезы готовили на ультрамикротоме LKB-3, дополнительно окрашивали 2%-ным раствором уранилацетата и лимоннокислым свинцом. Обнаружение вирусных частиц возбудителя крапчатости (*Carnation mottle carmovirus*, CarMV) в апикальной меристеме гвоздики осуществляли методом «давленных препаратов». Каждую меристему в отдельности помещали в специально сделанную лунку предметного стекла диаметром 2 мм в каплю стерильной дистиллированной воды и растирали. Затем гомогенат наносили на сетки-подложки, контрастировали 2%-ной ФВК и просматривали в электронном микроскопе марки Tesla (Чехословакия) и Jems-7 Япония).

В качестве основного метода исследований при разработке и оптимизации биотехнологии получения и клонального микроразмножения безвирусных растений

использовали культуру органов и тканей [6; 7, 9,10, 12, 22, 33, 40,67].

Освобождение растений от вирусной инфекции проводили последовательной интеграцией методов отбора внешне здоровых растений и тестирования их на вирусы, термо-, хемотерапии *in vitro* или *in vivo*, культуры апикальных меристем, индукции органогенеза и оптимизации условий культивирования регенерантов, адаптации пробирочных растений *in vivo* и их ретестирования на отсутствие вирусов.

Математическую обработку осуществляли на основе дисперсионного многофакторного анализа. Использовали также критерии Стьюдента и Пирсона. Были выявлены достоверные различия между сравниваемыми вариантами. В результате проведенного анализа были установлены оптимальные уровни значений факторов культивирования, обеспечивающие максимально благоприятный режим развития и размножения.

### Результаты и обсуждение

В процессе исследований нами идентифицировано 33 возбудителя вирусных болезней, обнаруженных нами в Крыму и на Украине на важнейших цветочно-декоративных культурах. Анализ выявленных вирусных болезней показал высокую степень поражения вирусами растений хризантемы, гвоздики, цимбидиума, розы, лилии, антуриума Андрэ, тюльпана, гладиолуса, гиппеаструма, гиацинта и др. При сильном поражении отмечено вырождение отдельных сортов и культур. Особенно опасное положение сложилось с луковичными и клубнелуковичными культурами в южных регионах.

Основным фактором, влияющим на распространение вирусов, является ввоз и размножение зараженного посадочного материала.

#### *Основные методы получения безвирусного посадочного материала*

**Культура апикальных меристем.** Использование метода культуры апикальных меристем для оздоровления растений от вирусной инфекции основано на принципе отсутствия вирусных частиц в верхушке роста растений.

Предположение о возможности отсутствия вируса в меристематических тканях больных растений впервые было высказано Чунгом [65] и Уайтом [70]. Вскоре, начиная с 50-х годов XX века, были предприняты первые успешные опыты по получению свободных от вирусов растений из точки роста [54, 66]. С тех пор техника оздоровления растений, основанная на выделении апикальных меристем, стала интенсивно совершенствоваться [1, 5, 16, 23, 24, 29, 46].

Теоретические концепции, положенные в основу этого метода, стали проясняться в последнее время: каков механизм этого явления, позволяющий получать относительно небольшое количество здоровых растений при культивировании меристем от больных растений. Авторы метода Morel и Martin [55] полагали, что в больном растении вирус распространяется с отставанием от быстро растущих молодых органов, особенно в молодых недифференцированных тканях, где концентрация вируса может снижаться вплоть до полного отсутствия.

Количественное подтверждение допускаемого явления технически оказалось трудновыполнимо из-за мелких размеров меристемы и низкой концентрации вирусов в них. Затруднительно также одну и ту же меристему одновременно использовать для анализа на присутствие вируса и для регенерации растения.

Применение электронной микроскопии часто обнаруживает наличие вирусов в меристеме пораженных ими растений, что, впрочем, подтверждает общеизвестный факт, что количество лишенных вируса растений после подобной операции чрезвычайно мало, и многие меристемы пораженных растений инфекционны [45].

Так, еще в конце 60-х годов D. Walkey и M. Webb [69] предложили метод «давленных препаратов» для электронномикроскопического анализа апикальной зоны *Nicotiana rustica* L., зараженной вирусами скручивания листьев вишни (*Cherry leaf roll virus*, CLRV), кольцевой пятнистости табака (*Tobacco ringspot nepovirus*, TRSV) и огуречной мозаики (CMV), и обнаружили изометрические частицы этих вирусов в куполе меристемы размером 100 мкм.

Этот метод был использован нами для обнаружения вируса крапчатости гвоздики (CarMV) в апикальной зоне меристемы пораженных растений цветущей гвоздики сорта Red Sim, зараженных этим вирусом. Каждую меристему в отдельности помещают в специальную лунку предметного стекла (диаметром 2 мм) с каплей стерильной дистиллированной воды и растирают. Приготовленный гомогенат наносили на сетки-подложки, контрастировали фосфорно-вольфрамовой кислотой и просматривали в электронном микроскопе. Во всех 25 приготовленных таким образом препаратах были обнаружены сферические вирусные частицы крапчатости гвоздики.

Структурной основой используемого на практике явления служит специфика строения точки роста растений: дистальная ее часть, представленная апикальной меристемой, у разных растений имеет средний диаметр 200 мкм и высоту от 20 до 150 мкм. В более нижних слоях дифференцирующиеся клетки меристемы образуют прокамбий, дающий начало пучкам проводящей системы. Такая особенность строения апикальной меристемы исключает проникновение в нее вируса путем быстрого транспортирования по проводящей системе, но допускает возможность медленного распространения через плазмодесмы, соединяющие меристематические клетки [8].

Возникновение в больном растении безвирусных участков связывается с разной скоростью деления клеток и роста апекса, мультпликации и распространения вируса. Более наглядно это проявляется у быстро растущих травянистых растений. Вместе с тем, в одном и том же растении разные вирусы или их штаммы внедряются в зону меристемы на разное расстояние, отчего вычлененная меристема может содержать один вирус и не содержать другого [32, 43, 64].

Таким образом, вопрос присутствия вирусов в точке роста зараженного растения и возможность репродукции их в меристематических тканях сегодня не вызывает сомнения. Доказательством тому являются результаты исследований А. Toussaint, D. Dekegel [68], и многолетние исследования, выполненные в Никитском ботаническом саду (1974-1988 гг.), подтвердившие методом электронной микроскопии локализацию вирусных частиц возбудителя *Odontoglossum Ringspot Tobamovirus* (ORSV) в цитоплазме, в вакуолеподобных структурах и прокамбии апикальных и латеральных меристем сильно пораженного вирусами сорта цимбидиума 'Angelica yellow'. Как показали наши исследования и практический опыт ряда меристемных лабораторий, из апикальных меристем растений гвоздики, пораженных вирусом крапчатости (CarMV), в условиях *in vitro* получают инфицированные мериклоны.

В принципе возможно получение безвирусной апикальной меристемы от больного растения, но при этом риск попадания вирусов в здоровые ткани должен быть снижен до нуля. Это может быть достигнуто специальными приемами, направленными на снижение скорости репродукции вирусов.

**Термотерапия.** Широко известным методом оздоровления зараженных вирусами растений является метод термотерапии, который подразделяется на два способа. Первый – применение горячей воды. Этот способ был изучен еще в 1936 году [50]. Так, при оздоровлении персика путем погружения зараженных побегов в воду с температурой 35° и 50°C положительных результатов получено не было. Аналогичные опыты были проведены с черенками вишни [53].

Как показали опыты, проведенные нами на цветочных культурах, погружение клубнелуковиц гладиолусов в горячую воду перед посадкой при температуре 50°, 55°, 60°C и экспозиции 15, 30, 45 минут степень развития симптомов вирусной мозаики на опытных и контрольных растениях почти не различалась и достигала 96,6 и 100% соответственно. Причем в вариантах опыта при температуре 50°C и увеличении экспозиции прогревания до 90-120 минут наблюдалась полная гибель клубнелуковиц [18]. Второй способ – применение горячего сухого воздуха – оказался сравнительно более эффективным, особенно при использовании вегетирующих цветочных растений, которые определенное время выдерживались в специальных термокамерах с регулируемой температурой  $37\pm 1^\circ\text{C}$ .

При термотерапии термолабильных вирусов иногда удается излечить растение целиком [42]. Однако чаще от вирусов освобождаются только верхушки побегов, отросшие во время термотерапии. Такие верхушки, как правило, прививают на безвирусный подвой или укореняют в тумане. Этот прием с успехом используется в сочетании с культурой меристемы для получения безвирусного посадочного материала плодовых и цветочно-декоративных культур [26, 28].

Для объяснения механизма освобождения растений от вирусов в процессе термотерапии существуют различные гипотезы. Согласно одной из них высокие температуры воздействуют непосредственно на вирусные частицы, через их рибонуклеиновую кислоту и белковую оболочку, вызывая физическое разрушение и лишая вирусные частицы инфекционности. Вторая гипотеза состоит в том, что высокая температура действует на вирусы через метаболизм растений [8,45]. Под влиянием высоких температур нарушается равновесие между синтезом и деградацией вирусов. Если преобладает синтез, то концентрация вируса в зараженных тканях растет, и наоборот.

Нашими исследованиями показано, что чем дольше экспозиция термотерапии и больший прирост цветочных растений, тем выше гарантия получения безвирусных верхушек. В связи с этим успех термотерапии цветочных культур, пораженных вирусными болезнями, прежде всего определяется конструкцией термокамеры, обеспеченностью ее вытяжкой и приточной вентиляцией, термотолерантностью сортов и культур, созданием оптимальных условий для роста растений [16, 52, 60].

Недельная предварительная адаптация растений к экстремальным условиям термотерапии (постепенное, начиная с 25°C, и ежедневное повышение температуры в термокамере на 2°C, доводя ее до  $37\pm 1^\circ\text{C}$ ) благоприятно влияет на состояние растений в термокамере и весь процесс терапии.

Не менее важно создать и поддерживать оптимальный режим на протяжении всего процесса термотерапии ( температура 37°C, освещенность лампами дневного света – 5 клк, фотопериод, в зависимости от культуры, 14-16 часов в сутки, 90% относительная влажность воздуха).

Продолжительность термотерапии всецело зависит от состава вирусов и их термолабильности. Если для гвоздики достаточно 10-12-недельного воздействия теплом, то для освобождения хризантемы от Б-вируса этот период длится 12 и более недель. Замечено, что хризантемы лучше выдерживают экстремальные условия тепловой обработки. Тем не менее, для растений цимбидиума, антуриума Андрэ и луковичных культур аналогичные условия терапии не приемлемы. Для этих культур наиболее перспективна термотерапия регенерантов в условиях *in vitro*.

В результате многолетних исследований нами доказана возможность массового получения безвирусного посадочного материала цветочных растений с использованием методов термотерапии в сочетании с культурой апикальных меристем.

Наряду с этим, выявлен положительный эффект высоких температур (37°C) на точку роста и процессы морфогенеза гвоздики, хризантемы, фрезии в условиях *in*

*in vitro*. Так, коэффициент дифференциации введенных в условия *in vitro* апикальных меристематических тканей увеличивается на 50-60%. Отмечено стимулирующее влияние термообработки на адаптацию регенерантов после пересадки из пробирок в условия *in vivo*.

В совокупности все это способствует увеличению выхода безвирусных маточных растений, количества черенков и повышению качества цветочной продукции (длинный устойчивый цветонос, крупный диаметр цветка и интенсивно окрашенные лепестки).

**Хемотерапия (Химиотерапия).** В последние годы все больше появляется сообщений о некоторых антивирусных веществах. Применение защитных мероприятий по отношению к вирусным болезням осложняется рядом обстоятельств, связанных со своеобразным взаимодействием вируса с клеткой растения-хозяина.

Усилия многих исследователей были затрачены на поиск ингибиторов, которые должны были блокировать заражение растений и процесс репродукции вирусов. В связи с этим возникли трудности, связанные с фитотоксичностью препаратов. Большинство соединений, обладающих антивирусной активностью, быстро инактивировалось в растениях при воздействии различных экологических факторов.

Обнадёживающие результаты получены рядом ученых с применением хемотерапии однолетних культур – картофеля, томатов, табака. Некоторые вещества способны инактивировать одновременно несколько вирусов [3]. Среди этих веществ – антибиотики (тетрацилин, иманин), дрожжи, витамины и другие. Были попытки применения вироцидов из группы тетрацилина против латентных вирусов яблони [15].

Значительный интерес в освобождении растений от вирусов представляет использование хемотерапии в сочетании с другими методами, такими как термотерапия, культивирование апикальных меристем.

Наши опыты показали эффективность совместного применения хемотерапии и культивирования меристематических тканей цимбидиума и розы. При освобождении цимбидиума от вируса кольцевой пятнистости одонтоглоссума (ORSV) и розы от комплексной мозаики, вироцид – виразол (рибавирин) и амиксин вносили непосредственно в питательную среду, с последующим культивированием апикальных меристем. Виразол (рибавирин) – синтетический нуклеозид, противовирусный препарат широкого спектра действия. Амиксин – иммуномодулирующий препарат широкого спектра действия.

Результаты опытов показали эффективность применения виразола и амиксина для ингибирования вируса кольцевой пятнистости одонтоглоссума цимбидиума. При положительных результатах освобождения розы от вирусов мозаики (78,2%) виразол проявил фитотоксическое действие: затормаживались процессы дифференциации меристематических тканей и пролиферации адветивных побегов розы. Весьма обнадёживающие результаты против вирусной и бактериальной инфекций показал амиксин в низких концентрациях (1-5 мг/л). Изыскание антивирусных веществ и их применение совместно с другими методами является целесообразным мероприятием.

#### **Биотехнология оздоровления цветочных культур**

Биотехнологии конкретных цветочных культур имеют общие для них закономерности, которые положены в основу построения модели системы освобождения цветочных растений от вирусов и размножения здорового посадочного материала.

**Модель системы освобождения цветочных культур от вирусов.** Концепция освобождения цветочных культур от вирусов представляет собой модель системы методов, объединенных в единый комплексный биотехнологический процесс: тестирование растений на вирусы, термо- и (или) хемотерапия пораженного генотипа в условиях *in vitro* и *in vivo*, культура апикальной меристемы или других тканей и клеток,

химические и физические условия регенерации растений и их адаптация *in vivo*, ретестирование регенерантов на вирусы, клональное микроразмножение безвирусного посадочного материала (рис. 1).



Рис. 1 Модель системы освобождения растений от вирусов

Fig. 1 Model system of plants improvement from viruses

Основными элементами модели являются: тестирование растений на вирусы, термо- или хемотерапия, культура апикальной меристемы, ретестирование адаптированных растений на вирусы.

Тестирование на отсутствие вирусов проводят с использованием высокочувствительных методов (растений-индикаторов, электронной микроскопии, ИФА и ПЦР-анализа).

Термотерапия цветочных растений проводится с предварительно высаженными растениями в вазонах или микропобегами и регенерантами *in vitro* в специализированных термокамерах в режиме температуры 37°C в течение 1,5-4 мес. При освещенности 4,5-6 клк и фотопериоде 12-16 ч в зависимости от биологических требований культуры. Экспозиция термотерапии устанавливается с учетом состава вирусов, термостойкости и термотолерантности сорта и культуры. Для растений, проявляющих повышенную чувствительность к действию температуры, проводится поэтапная преадаптация к экстремальным условиям термотерапии. Растения, угнетаемые высокими температурами (розы, цимбидиум, антуриум Андрэ, лилии, гиацинт и другие), подвергают хемотерапии в культуре *in vitro* с применением вироцидов (виразол, цианогуанидин, амиксин) или отбору безвирусных растений.

При невозможности проведения термо- и хемотерапии и в отсутствии здоровых растений, ткани растений помещают в культуру *in vitro* для прохождения термотерапии в изолированных условиях (антуриум Андрэ, орхидеи, розы и др.). Продолжительность культивирования меристематических тканей и получения регенерантов в зависимости от культуры длится от 1,5 до 4,5 мес. (гвоздика, хризантема, цимбидиум, роза). Так, у гвоздики и хризантемы нормально развитые регенеранты формируются в течение 1,5-2 месяцев; у розы – 4,5 месяца; у лилии, гиацинта и гиппеаструма – 3-4 месяца.

Условия выращивания создаются индивидуально для каждой культуры: питательные среды, температура, освещенность, продолжительность фотопериода.

Питательные среды составляют соответственно этапам морфогенеза растений (дифференциация, органогенез, ризогенез). Температура воздуха поддерживается в

пределах оптимума требования культуры (обычно 18-20°C для луковичных растений; 22-23°C – гвоздики, хризантемы, розы; 24-25°C – цимбидиума, антуриума). Освещенность в пределах 2,5-5 клк с фотопериодом 14-16 ч. Помещение регенерантов в естественные условия требует прохождения периода адаптации. Для этого растения высаживают в перлит или торфо-перлитную смесь, и создают им условия, близкие к тем, которые они имели в период *in vitro*. По завершении 3-4-недельной адаптации растения переносят в строго изолированную теплицу для доращивания и тестирования.

Ретестирование предусматривает выявление вирусной инфекции в регенерантах спустя 1,5-2 мес. После адаптации. Это позволяет обнаружить случайно сохранившуюся низкую концентрацию вирусных частиц. Проверка на отсутствие вирусов совпадает с первой прищипкой у гвоздики и хризантемы. Для гарантированного получения безвирусного посадочного материала выявленные образцы с низким (остаточным) содержанием вирусных частиц возвращают для повторного прохождения термотерапии.

Из оставшихся безвирусных растений создают маточник безвирусного супер-суперэлитного и суперэлитного материала.

На основе рассмотренной модели разработаны технологии получения и размножения безвирусного посадочного материала для конкретной экономически ценной культуры.

**Биотехнология получения и клонального микроразмножения безвирусного посадочного материала хризантемы (*Chrysanthemum x hortorum* Bailey).** Отбор внешне здоровых растений и тестирование их на вирусы наиболее чувствительным методом ИФА с последующим культивированием меристематической ткани способствует получению безвирусных клонов. Однако отыскать исходные безвирусные растения среди зараженных коллекционных и промышленных посадок хризантемы практически не представляется возможным. Применяемая за рубежом тепловая обработка растений с целью получения безвирусного посадочного материала гвоздики, хризантемы, пеларгонии нашла в цветоводстве практическое использование.

Проведенными исследованиями на хризантемах обнаружено 6 возбудителей вирусных болезней, причиняющих экономический ущерб: вирус аспермии томатов (*Tomato aspermy cucumovirus*, TAV), вирус мозаики (*Chrysanthemum carlavirus B*), вирус огуречной мозаики (*Cucumber mosaic cucumovirus*, CMV), вирус бронзовости (*Tomato spotted wilt tospovirus*, TSWV), вирус розеточности (*Chrysanthemum rosette virus*), вирус некроза табака (*Tobacco necrosis necrovirus*, TNV). Они вызывают деформацию соцветий, карликовость растений и различной формы хлоротические и некротические пятнистости листьев (рис. 2).

Многолетнее изучение, проведенное в Никитском ботаническом саду, показывает необходимость последовательного сочетания методов тепловой обработки растений, культуры меристематической ткани, тестирования и ретестирования на отсутствие вирусов.

Основные этапы биотехнологии получения безвирусного посадочного материала хризантемы представлены на схеме (рис. 3).

**Подготовка растений к термотерапии.** Используют сортовые стандартные черенки хризантемы, снятые с маточных растений, пораженных вирусными болезнями. Успешное укоренение черенков происходит в смеси торфа и перлита в соотношении 2:1. Укоренившиеся черенки высаживают в пластмассовые контейнеры (по 15 шт. в каждый размером 60 x 20 x 15 см) с субстратом, обогащенным всеми необходимыми элементами питания (в соответствии с требованиями культуры). В этих контейнерах субстрат не так быстро пересыхает и лучше аэрируется, чем в вазонах. До постановки растений в термокамеру их дважды прищипывают, а спустя 10 суток после второй прищипки помещают в термокамеру.

Адаптация растений к экстремальным условиям тепловой обработки начинают постепенно, с температуры 25°C; ежедневно ее повышают на 2°C в течение 6 суток и доводят до заданной 37±1°C. Этот период считают началом термотерапии.



Рис. 2 Различные симптомы вирусных болезней хризантемы  
Fig. 2 Different symptoms of virus disease of *Chrysanthemum x hortorum* plants

**Термотерапия.** Метод основан на способности высокой температуры подавлять вирусную репродукцию, затормаживать передвижение вирусных частиц (вирионов) во вновь отрастающих верхушках побегов. Важно создать оптимальные условия содержания растений в термокамере (рис. 4), которые бы способствовали образованию прироста. С этой целью термокамера должна быть оборудована лампами ЛДЦ-40, ДРЛФ-250 или другими, создающими интенсивность освещения, равную 3,5-4 клк/м<sup>2</sup>

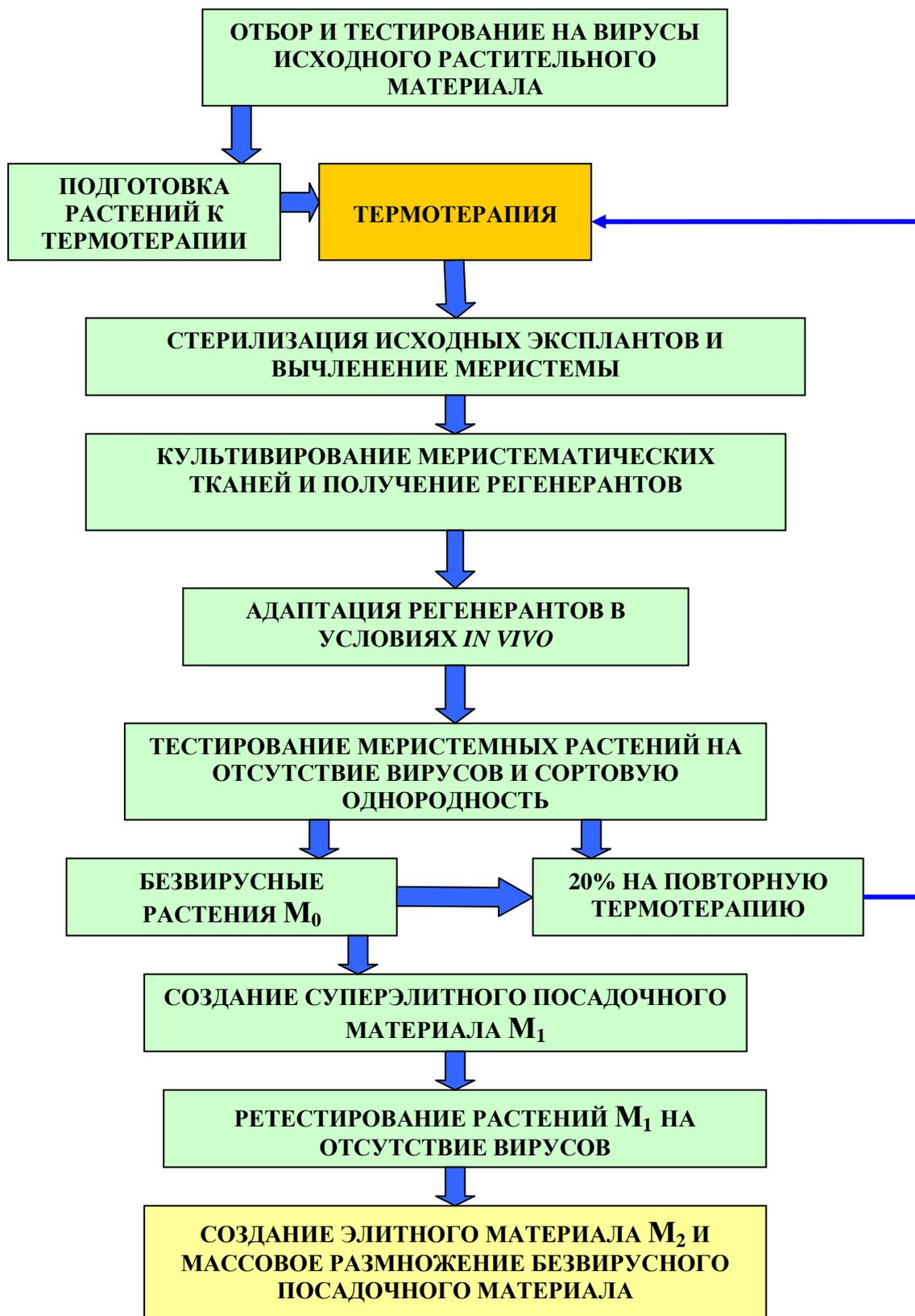


Рис. 3 Биотехнологическая схема получения безвирусного посадочного материала хризантемы  
Fig. 3 Biotechnological scheme for obtaining of *Chrysanthemum* virus-free planting material



**Рис. 4** Термо-терапия растений хризантемы  
**Fig. 4** Thermo-therapy of Chrysanthemum plants

при экспозиции фотопериода 14,5 ч/сут. Отключение ламп в ночное время снижает температуру воздуха с 37° до 26 С, что положительно влияет на растения и не вызывает репродукции вирусов. Главным условием содержания растений в термокамере является обеспеченность приточной и вытяжной вентиляцией.

Влажность в термокамере создают ежедневным 1-2-кратным опрыскиванием растений водой комнатной температуры. Замечено, что избыток влаги способствует хлорозу листьев, а недостаток вызывает слабый прирост. Подкормку растений в этот период проводят после анализа субстрата специалистами агрохимической службы.

Как показали наши исследования, продолжительность тепловой обработки находится в прямой зависимости от состава вирусов в той или иной культуре. Опытным путем нами определена экспозиция термо-терапии от 4 до 12 недель. Для большей гарантии освобождения растений от вирусов ее можно увеличивать до 14-18 недель, но в этом случае наблюдается сильное угнетение роста растений. Установлено, что хризантемы, зараженные вирусом аспермии (ТАV), можно с большей надежностью оздоровить при 4-недельной экспозиции термо-терапии. Растения, зараженные Б-вирусом, полностью оздоровить не удастся при 10-недельной экспозиции, даже в сочетании с культурой меристемы. Учитывая особенности вируса, его термостойкость, лучшие результаты (95%) достигнуты увеличением продолжительности термо-терапии до 12 недель. Гарантированное 100% освобождение растений от вирусов достигается повторной термо-терапией по замкнутому кругу (см. рис. 3).

Установлено положительное влияние тепловой обработки на точку роста растений и последующее культивирование апикальной меристемы, что позволяет увеличить ее размер до 0,3 мм, а это, в свою очередь, повышает коэффициент дифференциации до 80%. Наблюдается стимулирующий эффект приживаемости первичного экспланта и лучшая адаптация регенерантов при пересадке их из пробирок в субстрат.

**Стерилизация исходных эксплантов и вычленение меристемы.** После окончания термо-терапии с растений снимают черенки длиной 5-7 см, отросшие за период тепловой обработки, и дезинфицируют их в 1% растворе гипохлорита натрия с добавлением 2-3 капель детергента Tween-80. Продолжительность стерилизации не

превышает 5 минут, затем черенки пятикратно промывают в дистиллированной воде. Вычленение меристемы осуществляют под стереоскопическим микроскопом марки МБС-10. Используют в основном апикальные меристемы размером 0,25-0,3 мм. Работу выполняют в асептических условиях. Вычленяют меристемы стерильными инструментами (пинцеты, глазные медицинские скальпели, лезвия и др.). После каждой операции их дезинфицируют, вначале погружая в 10% раствор  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , затем обрабатывая 96% этанолом и обжигая в пламени спиртовки.

**Приготовление питательных сред.** В литературе приводятся различные рецепты питательных сред для выращивания хризантемы *in vitro*, в состав которых входят макро- и микроэлементы, витамины, регуляторы роста. В процессе испытания нами установлено, что большой выход нормально развитых растений с повышенной приживаемостью (при пересадке из пробирок в почвенный субстрат – 70-80%) отмечен на среде Буйса [34] в нашей модификации. Эта среда сокращает продолжительность роста и развития меристем в пробирке (от 2 месяцев до 4,5 недель). Для ее приготовления используют химически чистые реактивы, дистиллированную воду.

Агаризованную питательную среду Пирика [61] в модификации Новака [59] применяют для культивирования каллуса и регенерации проростков.

В таблице 1 приведены составы жидкой и агаризованной питательных сред для дифференциации меристемы и получения регенерантов, а также индукции каллусообразования из меристемы, адвентивных побегов и корней.

Таблица 1  
Состав питательных сред для культивирования меристемы и получения регенерантов хризантемы

Table 1  
Compounds of culture media for Chrysanthemum meristematic tissue cultivation and plants regeneration

Компоненты	Состав питательных сред, мг/л		
	дифференциация меристемы и получение регенерантов	индукция каллусообразования из меристематических тканей и пролиферация адвентивных почек	ризогенез
1	2	3	4
<u>Макроэлементы</u>			
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650	2475	825
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	440	220
$\text{KNO}_3$	1900	1900	950
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	370	185
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	170	85
<u>Fe-хеллат</u>			
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	37,3	37,3	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	27,8	27,8
<u>Микроэлементы</u>			
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2	6,2	6,2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	22,3	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	8,6	8,6
KJ	0,83	0,83	0,83
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,025
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,25
<u>Органические вещества</u>			
Никотиновая кислота	1,0	1,0	-

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
Пиридоксин·HCl	0,5	0,5	-
Тиамин·HCl	1,0	1,0	-
Глицин	2,0	2,0	-
Мезоинозит	100,0	100,0	10,0
Аденинсульфат	20,0	5,0	-
Са-пантотенат	1,0	1,0	-
Цистеин	1,0	-	-
Казеина гидролизат	500,0	500,0	-
Гибберелловая кислота	0,4	0,5	-
Кинетин	0,5	0,4	-
БАП	-	0,5	-
НУК	1,0	0,25	1,0-2,0
Сахароза	20000,0	20000,0	20000,0
Агар	-	7500,0	7500,0

### Культивирование меристематических тканей и получение регенерантов.

Первичные экспланты (апикальные меристемы) культивируют на жидких питательных средах с беззольными фильтровальными мостиками или на агаризованной среде. В зависимости от состава питательной среды нормально развитые миниатюрные растения получают в течение 4,5 недель. Через индукцию каллусообразования из меристемы и культивирования каллуса на агаризованной питательной среде (с добавлением витаминов и цитокининов) можно стимулировать большое число адвентивных побегов. В этом случае из одной меристемы получают более 20 микропобегов, которые укореняют на этой или вновь приготовленной питательной среде с добавлением ауксинов (НУК) (рис. 5).



Рис. 5 Ризогенез микропобегов хризантемы на питательной среде с добавлением НУК в концентрации 1,0-2,0 мг/л

Fig. 5 Rhizogenesis of Chrysanthemum microshoots on medium with 1.0-2.0 mg l<sup>-1</sup> of NAA

Пробирки с изолированными меристемами помещают в камеру искусственного климата, в которой поддерживают постоянную среднесуточную температуру воздуха 22-23°C с освещенностью 2,5-3 клк и фотопериодом 14,5 ч.

Контроль за ростом и развитием меристематических тканей осуществляют ежедневно. Во время осмотра все недоразвитые или отстающие в росте регенеранты выбраковывают. Питательная среда в пробирках должна постоянно оставаться прозрачной, ее помутнение указывает на проникновение в нее бактерий, такие пробирки сразу отбраковывают. Активность роста эксплантов в пробирке не одинакова.

Большой выход нормально развитых растений отмечают в октябре-ноябре и в апреле-августе. Это, прежде всего, связано с состоянием маточных растений, с которых сняты черенки и изолированы меристемы.

По мере развития эксплантов осуществляют пассажи на новые среды. Каллус пассируют через каждые 2 недели на свежеприготовленную среду. Спустя 4 недели формируются адвентивные побеги, а затем, еще через 2 недели, появляются корни.

**Адаптация регенерантов *in vivo*.** Миниатюрные растеньица (Mo) с хорошо развитой надземной частью (3-4 см) и корневой системой пересаживают из пробирок в почвенный субстрат. Этот этап технологии выполняют в специальном помещении для доращивания или в изолированной теплице со стабильными условиями: температурой 20-22°C, относительной влажностью 70-80%, освещенностью 3-4 клк в первые 10 дней и 5-7 клк в последующие, при фотопериоде 14-16 ч.

Меристемные растения пикируют из пробирок в предварительно продезинфицированные вазоны объемом 0,25 л со смесью торфа (рН 5,0-5,6) и перлита в соотношении 2:1. Смесью обеззараживают паром под давлением 4 атм. С экспозицией пропаривания 30-40 мин до момента достижения прогреваемой массы (слоем 25-30 см) температуры 90-100°C.

Техника пересадки сводится к тому, что растения крючком или пинцетом вынимают из колбы или пробирки. Это очень ответственный момент, и поэтому необходимы предельная осторожность и аккуратность. Растения вместе с мостиком переносят пинцетом в углубление предварительно увлажненной смеси. Если регенерант выращен на агаризованной среде, агар отделяют. После этого корни слегка присыпают, следя за тем, чтобы корневая шейка была на уровне смеси. Высаженные растения накрывают полиэтиленовыми изоляторами или оборудуют туннели из полиэтиленовой пленки и металлического каркаса и выдерживают под ними 8-10 дней для поддержания влажности и лучшей приживаемости растений. Спустя 7 дней после пересадки растения постепенно открывают. Недопустимо переувлажнение смеси, так как в этом случае корни быстро загнивают и растения погибают. При соблюдении оптимальных условий пересадки и ухода за растениями приживаемость составляет 80-90%. Как только растения достигают высоты надземной части 15 см, проводят первую проверку на отсутствие вирусов.

**Тестирование меристемных растений на отсутствие вирусов и сортовую однородность.** Одним из важнейших этапов получения безвирусного посадочного материала хризантемы является его тщательная проверка. Для своевременного выявления заражения вирусами меристемных растений (Mo) и репродукции M<sub>1</sub> проверку осуществляют в строго указанные сроки. Первую проверку Mo проводят в период, когда пересаженные из пробирок растения достигают высоты 15 см, что совпадает с первой прищипкой. Зараженные растения выбраковывают, а здоровые пересаживают (вторично) в более просторные вазоны. Снятую верхушку после прищипки укореняют и высаживают отдельно для проверки сорта. Второе тестирование выполняют перед началом размножения. Размноженные растения M<sub>1</sub>, выращиваемые в качестве безвирусного маточника, также подвергают тщательной двукратной проверке: первая проверка – перед первым снятием черенков, вторая – спустя 2-3 мес. После первой.

Для тестирования растений хризантемы на вирусы чаще всего используются иммунологические методы, среди которых наиболее перспективным является иммуноферментный анализ (ИФА или ELISA-тест). Главным преимуществом этого метода, по сравнению с биологическими, является его высокая чувствительность и возможность автоматизации проводимых анализов, что крайне необходимо при массовой проверке растений на отсутствие того или иного вируса. Однако для

проведения такого рода анализов необходимо иметь антисыворотки к конкретному вирусу, с высоким титром и специфичностью. Иммуноферментный анализ (ELISA-тест) является наиболее чувствительным серологическим методом. Он основан на получении конъюгатов с помощью ряда методов молекулярной биологии между иммуноглобулинами антисыворотки и белками высокоочищенных ферментов (фосфатаза, пероксидаза). В тех случаях, когда отсутствуют специфические антисыворотки для ИФА, применяют метод двойной диффузии в агар-геле.

Индикаторный метод (метод биологической проверки) путем механической передачи вируса с соком больного растения хризантемы на растения-индикаторы (*Chenopodium quinoa* Willd., *Petunia hybrida* L.), а также прививкой на сорт хризантемы Fanfara и Mistletoe (техника тестирования общепринятая), более трудоемкий. При отсутствии полного набора необходимых антисывороток к вирусам хризантемы, этот метод может быть применен в сочетании с серологическим.

**Безвирусные растения (Mo).** Растения, непосредственно выращенные из меристемы, принято именовать Mo (оригинальная меристема), после первой проверки на вирусы их высаживают в 2-литровые вазоны со стерильной смесью торфа и перлита в соотношении 3:1. Вазоны с растениями устанавливают в специально предназначенную, строго изолированную теплицу, с оптимальными условиями выращивания.

Продуктивность безвирусных растений зависит от многих факторов: растения особенно чувствительны к недостатку и избытку влаги, а также к повышенной температуре воздуха (выше 22°C); в этих случаях наступает преждевременное старение.

Формирование маточных меристемных растений является ответственным моментом биотехнологической схемы. Первую прищипку растений проводят одновременно с первой проверкой их на вирусы и сортовую однородность. Прищипывают обычно над хорошо сформированным листом, при этом особое внимание обращают на чистосортность маточных растений. Часть растений (20-30%) вновь подвергают тепловому воздействию с последующим повторением всех этапов технологии (культура меристем и т.д.). Это позволяет гарантировать 100% освобождение растений от возможного остаточного количества вирусов и сокращает необходимость массового тестирования.

**Создание суперэлитного посадочного материала M<sub>1</sub>.** Первое снятие черенков производят после второй проверки на отсутствие вирусов Mo. Черенки снимают регулярно по мере их готовности. Перед снятием черенков, за сутки, растения обильно поливают водой, а рано утром следующего дня черенки снимают. Недопустимо снимать с растения все побеги, так как это может резко снизить продуктивность маточного растения.

Черенки укореняются в течение 3-4 недель. В оптимальный (майский) период первые корни появляются через 7 суток. Количество укорененных черенков, в зависимости от сорта, колеблется от 85 до 100%.

Репродукцию M<sub>1</sub> используют для закладки суперэлитного безвирусного маточника и дальнейшего размножения элитного материала.

**Ретестирование на вирусы растений M<sub>1</sub>.** Повторная проверка растений на вирусы не отличается от методов, описанных выше, и проводится спустя 2-3 месяца после первой проверки.

**Выращивание безвирусных маточных растений и размножение посадочного материала in vivo.** Приемы и методы выращивания безвирусных маточников не отличается от выращивания обычных маточников хризантемы, за исключением более жесткого фитосанитарного контроля. Каждая репродукция должна содержаться в отдельных теплицах. Совершенно недопустимо появление в них тлей и трипсов,

являющихся переносчиками ряда вирусов (*Tomato aspermy cucumovirus*, TAV и *Cucumber mosaic cucumovirus*, CMV). Элитным посадочным материалом считают репродукцию М<sub>3</sub>.

**Биотехнология получения и размножения безвирусного посадочного материала гвоздики садовой (*Dianthus caryophyllus* L.).** Получение безвирусного посадочного материала гвоздики в промышленных масштабах осуществляется в Голландии, Дании, Бельгии, Франции, Германии. Попытка перевода гвоздики на безвирусную основу впервые сделана в Латвии [23].

Биотехнология, разработанная Никитским ботаническим садом, была внедрена в 1980 году в меристемном комплексе Крымского областного треста зеленого строительства (г. Симферополь) и в совхозе «Оранжерейный комплекс» Московской области. Применение биотехнологии предусматривает получение безвирусного посадочного материала гвоздики ремонтантной интеграцией последовательно используемых методов оздоровления.

Среди вирусных болезней гвоздики распространены и причиняют экономический ущерб культуре – крапчатость (*Carnation mottle carmovirus*, CarMV), прижилковая крапчатость (*Carnation vein mottle potyvirus*, CVMV), кольцевая пятнистость (*Carnation ringspot dianthovirus*, CRSV), латентная болезнь (*Carnation latent carlavirus*, CLV), мозаика резухи (*Arabis mosaic nepovirus*, ArMV).

Для гарантированного получения безвирусного исходного материала гвоздики необходимо проведение тепловой обработки растений по замкнутому циклу, а именно: отбор и тестирование на вирусы исходного растительного материала → термотерапия исходных растений → культивирование меристемы → получение регенерантов → тестирование и отбор здоровых растений → в случае остаточной инфекции 2-5% повторная термотерапия → культивирование меристемы → получение регенерантов → ретестирование и закладка безвирусного маточного питомника → массовое микроразмножение безвирусного посадочного материала.

Здесь представлен идеальный вариант получения безвирусной гвоздики. Возможно размножение безвирусного посадочного материала гвоздики *in vitro* после предварительной термотерапии, но в этом случае часто наблюдается остаточная вирусная инфекция (от 2 до 5%).

Ниже описывается содержание этапов биотехнологии:

Подготовка растений к термотерапии;

Термотерапия;

Стерилизация эксплантов и вычленение меристемы;

Питательные среды;

Культивирование меристематической ткани, получение микропобегов и регенерантов;

Адаптация регенерантов;

Ретестирование меристемных растений на отсутствие вирусов и сортовую однородность;

Содержание безвирусных меристемных растений (М<sub>0</sub>);

Выращивание и размножение суперэлитных (М<sub>1</sub>) и элитных (М<sub>2</sub>) растений.

**Подготовка растений к термотерапии.** Для термотерапии гвоздики ремонтантной используют сортовые стандартные укорененные черенки. Укореняют черенки в отдельной изолированной теплице, оборудованной искусственным туманом и автоматическим обогревом. Подготовку стеллажей для укоренения гвоздики осуществляют следующим образом: на дно стеллажа насыпают щебень слоем 2-3 см, затем – перлит слоем 7 см, хорошо уплотняют и увлажняют. Перлит должен быть увлажнен до такой степени, чтобы при сжатии в руке ком не рассыпался, и из него не вытекала вода.

Черенки берут с побегов, которые имеют 5-6 хорошо развитых междоузлий. Оставляют на растении побеги с 3 междоузлиями, а черенки с 2-3 междоузлиями снимают. Перед укоренением их замачивают в течение 3 часов в растворе индолил-3-масляной кислоты (ИМК) (из расчета 50 г препарата на литр воды) или в растворе  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты (НУК) с добавкой витамина В<sub>1</sub> (из расчета 20-50 мг НУК + 50-100 мг витамина В<sub>1</sub> на литр воды). В зимний период концентрацию НУК увеличивают до 100 мг/л и выдерживают в растворе в течение 24 часов.

Наибольший процент укоренения достигают при опудривании нижней части черенков (вместо замачивания в растворе) сухой смесью талька с НУК и витамином В<sub>1</sub> (из расчета 400 г талька, 60 мг НУК и 10 мг витамина В<sub>1</sub>). Состав смеси для опудривания готовят следующим образом: первоначально в 100 мл холодной дистиллированной воды растворяют витамин В<sub>1</sub>, затем – НУК в 100 мл дистиллированной воды, подогретой до 70-80°C. После охлаждения до комнатной температуры раствор НУК смешивают с витаминным, приготовленным ранее, заливают полученный комбинированный раствор в тальк и тщательно перемешивают до получения однородной массы. Для быстрого высушивания полученной смеси используют низкие фарфоровые или эмалированные ванночки. Кашицеобразную массу подсушивают в течение 4-5 дней, после чего растирают в ступке до порошкообразного состояния, затем расфасовывают в герметичную тару и хранят в темном сухом месте до применения. Для опудривания 1000 черенков гвоздики достаточно 200 г готовой смеси.

В период укоренения черенков необходимо соблюдать оптимальные условия влажности и температуры. Относительная влажность воздуха в теплице должна быть не ниже 75% при температуре воздуха 16-18°C. Температуру субстрата в стеллажах на уровне образования корней постепенно снижают. Она должна быть в первую неделю 18-20°C, во вторую – 16-18°C и третью – 14-16°C. Для предохранения черенков от прямых солнечных лучей делают притенение материалом из белой полотняной ткани, которую смачивают водой. В жаркие дни черенки 3-4 раза в сутки увлажняют путем опрыскивания, а в прохладные дни – 1-2 раза. Следует помнить, что переувлажнение благоприятствует развитию грибных заболеваний (альтернариоз, фузариоз) и снижает процент укорененных черенков. Продолжительность укоренения зависит от среднесуточной температуры воздуха в теплице и субстрате и может варьировать 21-23 сут – в летний и 30-35 сут – в зимний периоды.

Укорененные черенки с указанием сорта высаживают в 1,5-литровые вазоны, наполненные смесью торфа с перлитом в соотношении 3:1 при рН 6-6,5. Подготовку субстрата осуществляют заранее, при этом вносят все необходимые элементы питания. Вазоны с растениями помещают на доращивание в специальную теплицу, предназначенную для подготовки растений к термотерапии. После образования 6 междоузлий (спустя 2-3 недели с момента посадки) верхушку растения прищипывают над 5 междоузлием. При достижении боковыми побегами 2-3 см, растения помещают в термокамеру.

Перед началом термотерапии растениям создают предварительную недельную тепловую закалку. В первые два дня в термокамере поддерживают температуру 26°C. В этот период проводят внекорневую подкормку по листьям 0,1% раствором нитрата кальция, а затем постепенно в течение 6 дней температуру повышают на 2°C, вплоть до заданной. Перед окончанием закалки проводят жидкую подкормку растений NPK с микроудобрениями по Абелю.

**Термотерапия.** После предварительной подготовки растений температуру устанавливают на постоянный режим: 37,5°C с ежедневным 16-часовым фотопериодом и освещенностью 4,5-6 клк. Важным условием в этот период является поддержание

относительной влажности воздуха в термокамере не ниже 90% при постоянной принудительной циркуляции воздуха.

В период тепловой обработки растения находятся в экстремальных условиях, режим которых резко отличается от нормального. Поэтому они нуждаются в более тщательном уходе (полив, подкормки). За работой термокамеры ежедневно должны вестись наблюдения. Совершенно недопустимы перепады температуры внутри камеры и пересыхание субстрата в вазонах. Известно, что недостаток влаги, как и избыток, приостанавливает рост побегов и вызывает преждевременное старение тканей растений.

Подкормки растений микро- и макроэлементами проводят с учетом результатов анализа субстрата, выполняемого дважды в месяц агрохимической службой. Следует иметь в виду, что во время поливов и подкормок продолжительность этих операций в термокамере должна быть до минимума сокращена с тем, чтобы не нарушить режим термической обработки растений. Целесообразно в термокамерах иметь капельное орошение.

По истечении заданной 10-12-недельной экспозиции термокамера продолжает работать в прежнем режиме до снятия с растений черенков и вычленения меристем.

**Стерилизация эксплантов и вычленение меристемы.** Для этой цели пригодны черенки с растений, прошедших термотерапию (предварительную или повторную), или с безвирусных маточных растений ( $M_1$  и  $M_2$ ). Перед вычленением латеральных и апикальных меристем с черенков удаляют листья. Черенки дезинфицируют погружением на 5 мин в 10% раствор гипохлорита натрия ( $NaClO$ ) или на 3 мин в 0,08% раствор нитрата серебра ( $AgNO_3$ ) с последующим 4-кратным промыванием в стерильной дистиллированной воде. Подготовленные верхушки побегов помещают в стерильные чашки Петри с увлажненной фильтровальной бумагой (чтобы исключить их увядание) и переносят в стерильный бокс. Туда же устанавливают и пробирки с питательной средой.

Перед началом работы тщательно моют руки и дезинфицируют их 0,2% раствором хлорамина или 96% раствором этанола.

Все действия по изолированию меристемы производят стерильными инструментами (пинцетом, глазными скальпелями, лезвиями безопасной бритвы и др.). Вычленяют меристему с двумя зачатками листьев (примордиями) высотой 0,15-0,2 мм под стереоскопическим микроскопом при увеличении в 16 раз. Изолируют меристемы гвоздики в пробирки с жидкой питательной средой, осторожно помещая срезом на мостик из обеззоленной фильтровальной бумаги. Каждый раз, после очередного вычленения меристемы, инструменты дезинфицируют путем последовательного погружения вначале в 10% раствор  $Na_3(PO_4)_2$ , затем в 96% этанол и обжигают в пламени спиртовки.

**Питательные среды.** В литературе приводятся различные рецепты питательных сред для выращивания ремонтантной гвоздики *in vitro*, в состав которых входят макро- и микроэлементы, витамины, регуляторы роста. Большой выход нормально развитых растений с повышенной приживаемостью при пересадке из пробирок в субстрат (70-80%) получается на среде Буйса [34] в нашей модификации. На этой среде сокращается продолжительность роста и развития меристемы в пробирке (от 1,5-2 мес. До 3-4 нед.). Для приготовления питательной среды используют химически чистые реактивы (классификации ч, хч, чда) и дистиллированную воду (табл. 2).

Для ускорения процесса приготовления питательной среды целесообразно готовить запасные маточные растворы. Каждую группу веществ, как указано в прописи буквами А, Б растворяют в литре, а В, Г, Д, Е, Ж, З, И – в 0,5 л дистиллированной воды и хранят закрытыми в стеклянных сосудах (колбы с притертыми пробками) при температуре 3-5°C сроком не более 3-4 недель, следя за их состоянием. При появлении осадка или хлопьев раствор теряет пригодность. Компоненты в этих растворах находятся в увеличенных концентрациях, соответственно рассчитанных на

определенный объем рабочего раствора. В качестве примера в таблице 3 приводится расчет веществ в граммах на 40 л рабочего раствора. Вещества группы К взвешивают и растворяют отдельно непосредственно в момент приготовления питательной среды.

**Таблица 2**

**Состав питательной среды для культивирования меристемы и получения регенерантов гвоздики**

**Table 2**

**Compounds of culture medium for *Dianthus caryophyllus* meristematic tissue cultivation and obtaining of regenerants**

	Компоненты	К-во вещества, мг/л
А.	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,0
Б.	KNO <sub>3</sub>	1900,0
В.	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,0
	KJ	0,83
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25
	Г.	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O
Д.	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440,0
Е.	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370,0
	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22,3
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,6
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025
Ж.	Na <sub>2</sub> EDTA	37,3
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8
З.	Аденинсульфат	40,0
	Са-пантотенат	1,0
	Биотин	0,05
И.	Глицин (гликокол)	2,0
	Никотиновая кислота (витамин В <sub>3</sub> )	1,0
	Пиридоксин·HCl (витамин В <sub>6</sub> )	1,0
	Тиамин·HCl (витамин В <sub>1</sub> )	1,0
К.	Казеин гидролизат	500,0
	НУК (α-нафтилуксусная кислота)	1,0
	Кинетин	0,4-1,0
	Мезоинозит	100,0
	Гибберелловая кислота	0,5
	Сахароза	30000,0
	Дистиллированная вода	1000,0 мл

Следует отметить, что от правильного приготовления питательной среды зависит успех всего технологического процесса. Поэтому важно при взятии навески обращать внимание на формулу химического соединения (безводная или кристаллизационная с водой) и в случае необходимости делать соответствующие перерасчеты.

Вещества (биотин, аденин, хелат железа, казеин гидролизат, НУК), плохо растворимые в воде, подогревают на водяной бане или растворяют в 96% этаноле.

Для приготовления 1 литра питательной среды в мерную колбу вначале наливают 300-500 мл дистиллированной воды и затем последовательно вливают маточные растворы в следующем объеме: группы веществ А – Б по 25 мл, В – И по 12,5 мл.

Вещества группы К растворяют каждое отдельно и сливают в ту же колбу. После добавления сахарозы объем раствора доводят до 1 л дистиллированной водой, затем тщательно перемешивают магнитной мешалкой. Приготовленную среду (рН 5,0-5,5) разливают в предварительно вымытые и простерилизованные биологические пробирки с вложенными в них беззольными мостиками из фильтровальной бумаги.

Таблица 3

Расчет веществ для приготовления маточных растворов питательной среды, необходимых для культивирования меристематических тканей гвоздики ремонтантной

Table 3

Calculation of substances for preparation of stock solutions of culture medium used for the cultivation of meristematic tissue *Dianthus caryophyllus*

	Компоненты	К-во вещества, г/40 л
А.	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	66,0
Б.	KNO <sub>3</sub>	76,0
В.	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,248
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,8
	KJ	0,033
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,007
Г.	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,001
Д.	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	17,6
Е.	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	14,8
	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,892
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,344
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,001
Ж.	Na <sub>2</sub> EDTA	1,42
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,114
З.	Аденинсульфат	1,6
	Са-пантотенат	0,04
	Биотин	0,04
И.	Глицин (гликокол)	0,8
	Никотиновая кислота (витамин В <sub>3</sub> )	0,04
	Пиридоксин·НСl (витамин В <sub>6</sub> )	0,04
	Тиамин·НСl (витамин В <sub>1</sub> )	0,04

Среду в объеме 4-5 мл, разливают в пробирки, закрывают стерильной фольгой, помещают в металлический контейнер и автоклавируют 10 мин при 0,8-1,0 атм. (105-115°C).

Готовую среду обычно используют в течение 3-5 сут, так как в длительно хранящейся среде могут быть замедлены процессы морфогенеза.

**Культивирование меристематической ткани, получение множественных микропобегов и регенерантов.** Пробирки с изолированными меристемами помещают в камеру искусственного климата, в которой обеспечивается постоянная температура воздуха 22,5°C, освещенность 3-3,5 клк и фотопериод 16 ч.

Контроль за ростом и развитием меристематических тканей осуществляют ежедневно. Питательная среда в пробирках должна оставаться прозрачной. Помутнение ее указывает на проникновение в пробирку бактерий. Такие пробирки сразу отбраковывают. Интенсивность дифференциации меристематических тканей и процессы морфогенеза происходят неодинаково в различные сезоны года. Большой выход нормально развитых регенерантов отмечается с декабря по апрель и несколько слабее – в мае – июле. Причина, по-видимому, связана с состоянием маточных растений, с которых сняты черенки и изолированы меристемы.

Особенность получения множественных микропобегов из меристематической ткани состоит в том, что из одной меристемы можно получить неограниченное количество растений (рис. 6). Принцип способа размножения заключается в следующем: от заранее проверенного безвирусного растения снимают черенок, затем вычлняют меристему и помещают ее на фильтровальный мостик в пробирку с жидкой питательной средой Буйса в нашей модификации (добавляют БАП в количестве 0,5-

2,0 мг/л). Затем пробирки с эксплантами переносят в климатическую камеру, в которой спустя 3-4 недели формируется несколько микропобегов высотой 2-3 см.

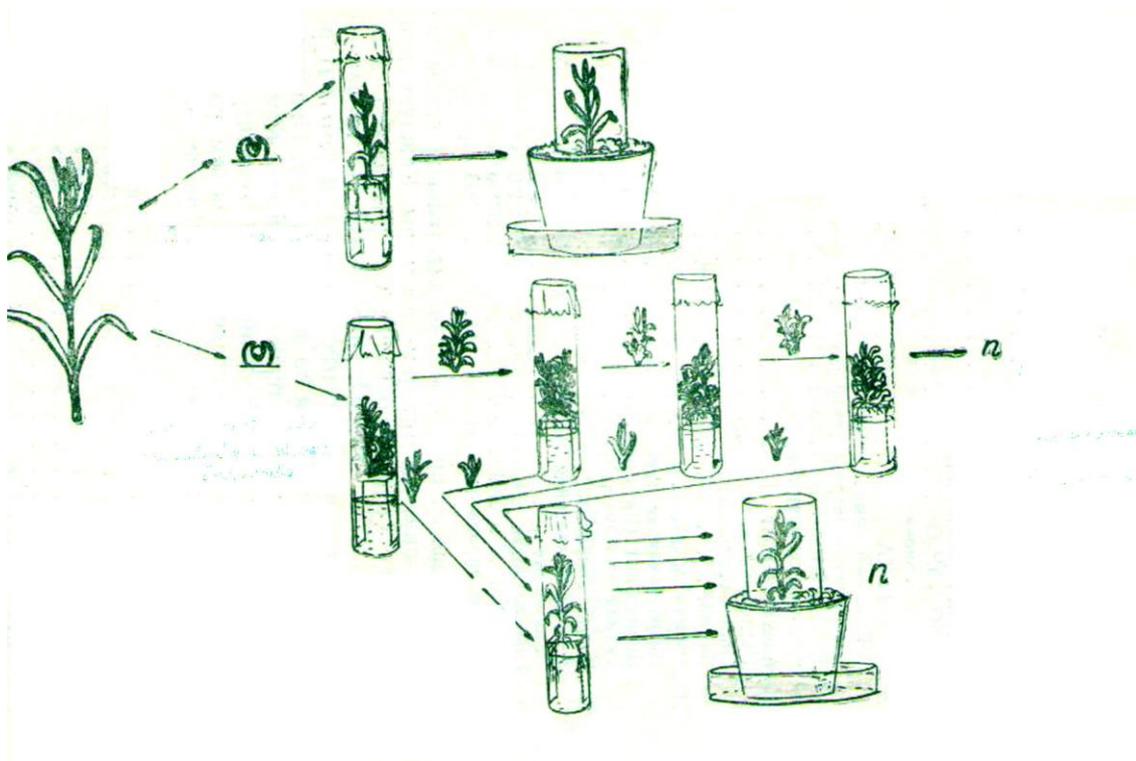


Рис. 6 Биотехнологическая схема массового размножения безвирусных растений гвоздики ремонтантной

Fig. 6 Biotechnological scheme of mass propagation of *Dianthus caryophyllus* virus-free plants

Изолирование и пересадку микропобегов, также как и вычленение меристемы, проводят в стерильном боксе. Часть наиболее развитых микропобегов отделяют и переносят каждый в индивидуальную пробирку на фильтровальный мостик, исключив из питательной среды БАП, и помещают в климатическую камеру для корнеобразования. Исходную активно делящуюся меристематическую ткань с 1-2 микропобегами оставляют в пробирке с питательной средой для индукции новых микропобегов и дальнейшего размножения. Укоренение изолированных из меристематической ткани микропобегов происходит спустя 5-7 суток.

**Адаптация регенерантов *in vivo*.** Для выполнения этого этапа биотехнологии необходима специальная изолированная теплица со стабильными условиями: температурой 20-22°C, относительной влажностью воздуха 80-90%, освещенностью 3,5-5 клк в первые 5 сут и 5-7 клк в последующий период, с фотопериодом 14-16 часов.

Регенеранты пересаживают из пробирок в вазоны со смесью стерильного торфа (рН 6,0-6,5) и перлита в соотношении 1:1. Техника пересадки – очень ответственный момент, и поэтому необходима предельная осторожность и аккуратность. Растения переносят в углубление предварительно увлажненной смеси. После этого корни слегка присыпают, следя за тем, чтобы корневая шейка была на уровне смеси. Высаженные растения накрывают тонкостенными прозрачными изоляторами или специальной укрывной тканью типа «Малимо» (на 10-12 сут) для поддержания влажности и лучшей приживаемости растений (рис. 7). Каждое растение маркируют с указанием сорта.

Начиная с четвертого дня пересадки, проводят умеренный полив растений водой комнатной температуры. Недопустимо переувлажнение смеси, так как в этом случае

корни быстро загнивают и растения погибают. При соблюдении оптимальных условий пересадки и ухода за растениями приживаемость составляет 70-80%. Как только растения окрепнут и достигнут высоты надземной части 15 см, проводят первую проверку на отсутствие вирусов. Зараженные растения выбраковывают, а здоровые пересаживают (вторично) в более просторные вазоны.



Рис. 7 Адаптация растений гвоздики ремонтантной в теплице  
Fig. 7 *Dianthus caryophyllus* plants adaptation in greenhouse

**Ретестирование меристемных растений и их репродукций на отсутствие вирусов.** Одним из важнейших этапов технологии получения безвирусного посадочного материала гвоздики является его тщательная проверка. Для своевременного выявления заражения вирусами меристемных растений ( $M_0$ ) и их репродукций ( $M_1$  и  $M_2$ ) проверку осуществляют в строго указанные сроки. Первую проверку  $M_0$  проводят в период, когда пересаженные из пробирок в субстрат растения достигнут высоты 15 см, что совпадает с первой прищипкой, и вторую – перед первым снятием черенков. Размноженные растения  $M_1$ , выращиваемые в качестве безвирусного маточника, также подвергают тщательной двукратной проверке. Первая проверка – перед первым снятием черенков и вторая – спустя 4 месяца после первой.  $M_2$  проверяют однократно и выборочно (30%) после второй прищипки, используя в этом случае метод ИФА.

Для выявления вирусных болезней растений применяют различные методы: растений-индикаторов, электронной микроскопии, серологический, ПЦР-анализ.

Как известно, метод растений-индикаторов позволяет выявить вирусы с наибольшей достоверностью путем механической передачи вируса с соком больного растения гвоздики на травянистые тест-растения (*Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn, *Vaccaria pyramidata* Medik. др.). По реакции тест-растений определяется вирус. Однако проверка этим методом требует специальных изолированных теплиц для выращивания здоровых тест-растений и содержания инокулированных растений-индикаторов.

Электронномикроскопический метод применяют для быстрого и прямого обнаружения вирусных частиц.

Для приготовления препаратов используют чаще других метод разбавленной суспензии, предложенный А.Е. Проценко [25]. Берут небольшой участок ткани проверяемого растения, приблизительно 1 см<sup>2</sup>, тщательно растирают в фарфоровой

ступке с 3-5 мл дистиллированной воды, затем центрифугируют для осаждения растительных примесей. Каплю очищенной суспензии пастеровской пипеткой или платиновой петлей наносят на приготовленные заранее сетки с коллодиевой пленкой (подложкой). Для получения коллодиевых пленок каплю 1% коллодия, растворенного в амилацетате, наносят на поверхность дистиллированной воды, налитой в специальную широкую чашку (со сливным отверстием на дне) и уложенными в ней предметными стеклами с опорными стенками. Капля коллодия быстро растекается по поверхности воды, образуя равномерную пленку. Уровень воды в чашке понижают, и коллодиевая пленка опускается на опорные сетки, на которые после подсушивания наносят суспензию проверяемого образца. Затем капле дают подсохнуть и проводят контрастирование путем оттенения металлом (хром, вольфрам). Исследуемый препарат помещают в вакуумную камеру под некоторым углом к направлению рассеивания частиц металла, напыляют и затем просматривают в электронном микроскопе. Для более быстрого приготовления препаратов в последние годы контрастирование проводят фосфоровольфрамовой кислотой (ФВК). На каждое проверяемое растение препарат готовят в трехкратной повторности.

Серологический метод, как и предыдущий, применяют для быстрого обнаружения вирусов в соке, полученном из проверяемого растения. Для этого необходимы сыворотки ко всем распространенным и вредоносным вирусам, поражающим гвоздику в разных географических зонах.

Известны разные методы постановки серологических реакций – латекс-тест, ELISA-тест, тест радиальной иммунодиффузии и другие. Однако наиболее эффективным признан метод ИФА и ПЦР-анализ.

**Содержание безвирусных меристемных растений.** Меристемные растения, которые в нашей стране принято именовать Мо (оригинальная меристема), после первой проверки на отсутствие вирусов высаживают в 2-литровые вазоны со стерильной смесью торфа и перлита в соотношении 3:1 со всеми необходимыми элементами питания при pH 6,0-6,5.

Вазоны с растениями устанавливают на стеллажи в специально предназначенную изолированную теплицу с оптимальными условиями выращивания.

Продуктивность меристемных растений зависит от многих факторов. Растения особенно чувствительны к недостатку и избытку влаги, к повышению (25°C) и понижению (до 8°C) температуры воздуха, что способствует преждевременному их старению, растрескиванию стеблей и потере продуктивности маточника.

Стимулирующим фактором роста растений является освещенность, которая в дневное время при 12-15°C должна быть не выше 6 клк; при 16-20°C – 1,5-2 клк, с фотопериодом 12 ч.

Формирование маточных меристемных растений является наиболее ответственным моментом всей биотехнологической схемы. Первую прищипку растений проводят одновременно с первой проверкой их на отсутствие вирусов. Прищипывают обычно над 5 хорошо сформированным междоузлием. Особое внимание при этом уделяют сортовой однородности материала. Для этого снятый черенок с растения Мо укореняют и высаживают на цветение, а затем оценивают.

Если имеется остаточная инфекция, проводят повторную термотерапию, для этого снимается побег с Мо, укореняется и материал готовится к термотерапии. Опыт показывает, что каждое растение Мо должно использоваться только для вегетативного размножения. Первое снятие черенков с Мо осуществляют после второй проверки на отсутствие вирусов. Перед этим за сутки растения обильно поливают водой, и рано утром следующего дня черенки снимают. Снятие с растений всех черенков сразу резко

снижает продуктивность маточного растения. Для укоренения черенков применяют разные методы: в субстрате и без него (аэропоника).

Маточные безвирусные растения Мо используют со дня первого снятия черенков в течение года. По истечении этого срока маточные растения выбраковывают и заменяют новыми.

**Выращивание и размножение супер-суперэлитных ( $M_1$ ) и суперэлитных ( $M_2$ ) растений.** Укорененные черенки с Мо после проверки на отсутствие вирусов используют для создания маточника суперэлиты. Приемы и методы выращивания маточников первой и последующих репродукций, в дополнение к обычным для маточников ремонтантной гвоздики, предусматривают: двукратную проверку на отсутствие вирусов; более тщательный фитосанитарный контроль за каждой репродукцией.

Как показал наш опыт, маточные растения, полученные из безвирусных меристематических тканей, отличаются усиленным ростом и ветвлением. Размножаемый посадочный материал свободен не только от вирусов, но и не менее опасного заболевания – фузариоза. Выращенные цветы крупнее (до 10-12 см в диаметре), цветонос длинный (до 100 см), но прочный.

Таким образом, проведенные многолетние исследования и результаты внедрения биотехнологии получения безвирусного посадочного материала в цветоводческих промышленных хозяйствах показали, что выращивание безвирусных маточных растений ремонтантной гвоздики, их репродукций, безвирусного посадочного материала и цветов экономически оправдано. Прежде всего, это определяется высокой продуктивностью, более длительным их использованием, большим количеством и высоким качеством цветочной продукции (отсутствие растрескивания чашечки цветка, длинный и прочный цветонос, крупный интенсивно окрашенный цветок, дольше сохраняющийся в срезанном состоянии, чем обычная гвоздика).

**Биотехнология получения и клонального микроразмножения безвирусного посадочного материала цимбидиума (*Cymbidium hybridum*).** Широкое внедрение орхидей в цветоводство продолжительное время сдерживалось отсутствием надежных методов оздоровления и получения безвирусного посадочного материала. Как показывают исследования, среди орхидей цимбидиумы относятся к культурам, наиболее сильно поражаемым вирусами. Учитывая биологические особенности культуры цимбидиума, в последовательность выполнения этапов биотехнологии получения и клонального микроразмножения безвирусного посадочного материала были внесены некоторые изменения.

На растениях изучаемых сортов цимбидиума выявлены: вирус мозаики цимбидиума (*Cymbidium mosaic potexvirus*, CyMV), вирус кольцевой пятнистости одонтоглоссума (*Odontoglossum ringspot nepovirus*, ORSV), вирус кольцевой пятнистости цимбидиума, (*Cymbidium ringspot tombusvirus*, CyRSV), вирус мозаики ванды (*Vanda mosaic virus*, VMV), вирус кольцевой пятнистости томатов (*Tomato ringspot nepovirus*, ToRSV). При этом значительный экономический ущерб выращиванию культуры цимбидиума причиняют два возбудителя вирусных заболеваний – CyMV и ORSV. Для обнаружения вирусов инокулируют растения-индикаторы и применяют метод ИФА.

Биотехнология включает следующие этапы:

Отбор и тестирование исходного материала на отсутствие вирусов;

Питательные среды;

Стерилизация растительного материала, вычленение меристемы и получение регенерантов;

Термо- и хемотерапия;

Условия культивирования меристематических тканей, протокормов и регенерантов;

Адаптация регенерантов *in vivo*;

Ретестирование меристемных растений и их репродукций на отсутствие вирусов;

Создание суперэлитных маточных посадок.

**Отбор и тестирование на отсутствие вирусов исходного материала.** Отбор здоровых растений проводят внутри существующих коллекций путем внешнего осмотра генотипов. Отбирают внешне бессимптомные растения, затем их тестируют на отсутствие вирусов методом ИФА и инокуляцией растений-индикаторов *Chenopodium amaranticolor* Coste et Reyn., *Gomphrena globosa* L., *Tetragonia expansa* Murr., *Beta vulgaris* L. В случае отсутствия вирусов исходные растения цимбидиума используют в размножении *in vitro*.

Быстрым и наиболее чувствительным является метод ИФА, с помощью которого на приборе «Сумаль» в течение рабочего дня можно проверить 500 и более образцов.

Однако среди большого количества проверенного материала безвирусные растения оказались единичными (табл. 4).

**Таблица 4**

**Сравнительная эффективность методов получения здорового посадочного материала цимбидиума**

**Table 4**

**Comparative efficiency of methods for *Cymbidium hybridum* healthy planting material obtaining**

Методы	Число изолированных меристем, шт.	Развилось растений, %	Адаптировано растений, шт.	Число тестированных растений, шт.	Число безвирусных растений, %
Отбор внешне бессимптомных растений и их тестирование на вирусы	-	-	-	100	1,0±0,27
Культура меристемы	100	70,0±0,65	70	70	1,0±0,23
Термотерапия регенерантов <i>in vitro</i> в течение 6 недель (с последующим вычленением меристемы)	200	80,0±0,89	160	160	80,0±0,94
Хемотерапия (добавление в питательную среду вирицидов)	50	100,0	50	50	100,0

**Питательные среды.** Питательные среды готовят на дистиллированной воде. Для ускорения рабочего процесса целесообразно заранее приготовить маточные растворы макро- и микроэлементов.

Важным фактором культивирования орхидей является pH среды (для цимбидиума оптимальная величина pH – 5,0), которую необходимо определять перед автоклавированием.

Для выращивания эксплантов можно использовать агаризованные и жидкие питательные среды. Известно, что жидкие среды более эффективны для индукции образования протокормов и каллуса, а твердые – для дифференциации тканей и органогенеза. Однако многие исследователи используют среды обоих типов. При применении жидкой среды стимулирующим приемом является ротирование среды и эксплантов с помощью специальных шейкеров и роллеров.

Несмотря на разные генотипы растений и цели использования методов тканевой культуры, потребность в отношении минеральных солей в среде примерно одинакова. Нами разработаны четыре модификации питательных сред Murashige-Skoog [56] и Knudson «С» [48]: для дифференциации меристематических тканей и индукции протокормов; пролиферации протокормов, регенерации проростков и ризогенеза (табл. 5).

Составы питательных сред для культивирования цимбидиума

Таблица 5

Compounds of culture media for *Cymbidium hybridum* cultivation

Table 5

Компоненты	Составы питательных сред, мг/л			
	дифференциация меристематических тканей, индукция протокормов	пролиферация протокормов	регенерация проростков и их развитие	ризогенез и рост регенерантов
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	250,0	250,0	250,0	250,0
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1000,0	1000,0	1000,0	1000,0
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	500,0	250,0	250,0	250,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250,0	250,0	250,0	250,0
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	27,8	27,8	27,8
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	37,3	37,3	37,3	37,3
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	25,0	25,0	25,0	25,0
$\text{H}_3\text{BO}_3$	10,0	10,0	10,0	10,0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10,0	10,0	10,0	10,0
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,25	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,025	0,025
Глицин	2,0	-	-	-
Пиридоксин·HCl	0,5	-	-	-
Тиамин·HCl	0,4	-	-	-
Никотиновая кислота	0,5	0,5	0,5	-
Кинетин	0,4	-	-	-
Активированный уголь	-	2000,0	2000,0	2000,0
ИМК	-	-	-	0,5
Мезоинозит	100,0	100,0	100,0	-
Сахароза	30000,0	4500,0	4500,0	20000,0
Глюкоза	-	25500,0	25500,0	-
Агар	7500,0	7500,0	7500,0	7500,0

Так как эксплант растительной ткани вначале питается гетеротрофно, то питательная среда содержит углеводы. Потребность в углеводах обычно удовлетворяется за счет сахарозы (2-4%), реже в этих целях используют глюкозу. В наших опытах с культурой цимбидиума выявлена обратная зависимость. Установлена зависимость ростового индекса и интенсивности пролиферации протокормов от сочетания в питательной среде сахарозы и глюкозы. Наиболее интенсивная пролиферация протокормов отмечена при сочетании сахарозы в концентрации 4,5 г/л и глюкозы – 25,5 г/л. Одновременно изучали интенсивность пролиферации протокормов цимбидиума при различном сочетании сахаров и регуляторов роста. Установлен максимальный ростовой индекс при отсутствии в питательной среде БАП. В опыте за 4 мес. Из одной меристемы получено 73 протокорма, из которых выращено 2000 новых протокормов и столько же регенерантов.

Стимулирующее действие на рост и количество корней оказывает ИМК в концентрации 0,1 мг/л питательной среды. При этих условиях наблюдают быстрое и массовое размножение цимбидиума. Из ауксинов для ризогенеза используют 3-

индолилуксусную кислоту (ИУК) в концентрации 0,25 мг/л;  $\alpha$ -нафтилуксусную кислоту в концентрации 0,5 мг/л; индолил-3-масляную кислоту (ИМК) в концентрации от 0,1 до 0,5 мг/л. Ауксины благоприятно влияют на рост меристематических тканей, а также на формирование корневой системы.

**Стерилизация, вычленение меристематической ткани и получение регенерантов.** Для стерилизации тканей применяют различные стерилизующие агенты: гипохлорит Са или Na, нитрат серебра, хлорамин и др. Лучшим дезинфектором по эффективности и простоте приготовления является гипохлорит Na (NaClO), который готовится в лаборатории или используется препарат заводского изготовления (“Serva”, Германия).

Получение стерильного исходного материала является сложной задачей, поскольку поверхность ткани всех органов цимбидиума заражены спорами эпифитных бактерий и грибов. Особенно трудно поддаются стерилизации туберидии цимбидиума, у которых эндогенные микоризные грибы проникают глубоко в ткани. В связи с этим рекомендуется во время пересадки растений (апрель-май) отделять «спящие» туберидии от клона и высаживать их в сфагновый мох. Через месяц почки, расположенные на туберидии, прорастают, образуя молодой побег. Когда побег достигнет 8-10 см, его отделяют, а туберидий снова помещают в мох и на нем прорастает следующая почка. Таким образом, от туберидия можно получить 1-4 молодых побега. Побеги, отделенные от туберидия или взрослых растений, освобождают от основных листьев, хорошо промывают дистиллированной водой и помещают на 40 с в 70% этанол с 2-3 каплями детергента Tween-80 с последующей стерилизацией в 5% гипохлорите натрия в течение 15 мин. Заканчивается стерилизация 4-кратной промывкой в стерильной дистиллированной воде.

При клональном микроразмножении в культуре *in vitro* из одной безвирусной меристемы путем деления протокормов можно получить десятки и сотни тысяч здоровых растений в год. Регенеранты не только идентичны с материнскими растениями, но свободны от вирусов и других патогенов.

Вычленение меристематических тканей проводят в ламинарном боксе (Fatran Lf, Чехия) с помощью стереоскопического микроскопа (МБС-10), используя для этой цели стерильные скальпели, иглодержатели, лезвия. Зачатки листьев расщепляют скальпелем и удаляют, обнажая пазушные почки (рис. 8). Обычно на молодом побеге, в зависимости от его размера, можно обнаружить 2-4 хорошо развитых и несколько недоразвитых почек.

Выживаемость первичного экспланта на питательной среде зависит от его величины. Чем больше размер вычлененной меристемы, тем выше гарантия его дифференциации. Но при этом следует иметь в виду, что у зараженных вирусами растений цимбидиума локализация наиболее опасного вируса орхидных – *Odontoglossum ringspot tobamovirus* – находится в меристематической ткани. Поэтому даже у растений, подвергнутых термотерапии, целесообразно вычленять небольшой эксплант размером 0,5 мм. Размер экспланта контролируется окуляр-микрометром. Меристематические ткани вырезают и сразу помещают на питательную среду.

Через 1-1,5 мес. Из экспланта образуется первичный протокорм.

**Термо- и хемотерапия.** Проведенными исследованиями показана невозможность проведения термотерапии растений цимбидиума при температуре 35-37°C, поэтому нами была применена термотерапия регенерантов в условиях *in vitro*. Колбы с регенерантами помещают в термокамеру на 6 недель при температуре 37°C, освещенности 2 клк и с 16-часовым фотопериодом. Затем из регенерантов, прошедших термотерапию, вычленяют апикальную меристему и помещают на питательную среду.

Наряду с термотерапией используют метод хемотерапии в условиях *in vitro* с применением ингибиторов вирусов – виразола и амиксина. Ингибиторы вирусов вводят

в питательную среду, на которую помещают меристематическую ткань и протокормы. Оптимальной концентрацией виразола является 50 мг/л, амиксина – 1-3 мг/л. Более высокие концентрации подавляют ростовые процессы у эксплантов. Метод оказался эффективным и регенеранты, прошедшие повторное тестирование методом ИФА, оказались свободными от вирусов. Безвирусные растения используют в массовом размножении посадочного материала.

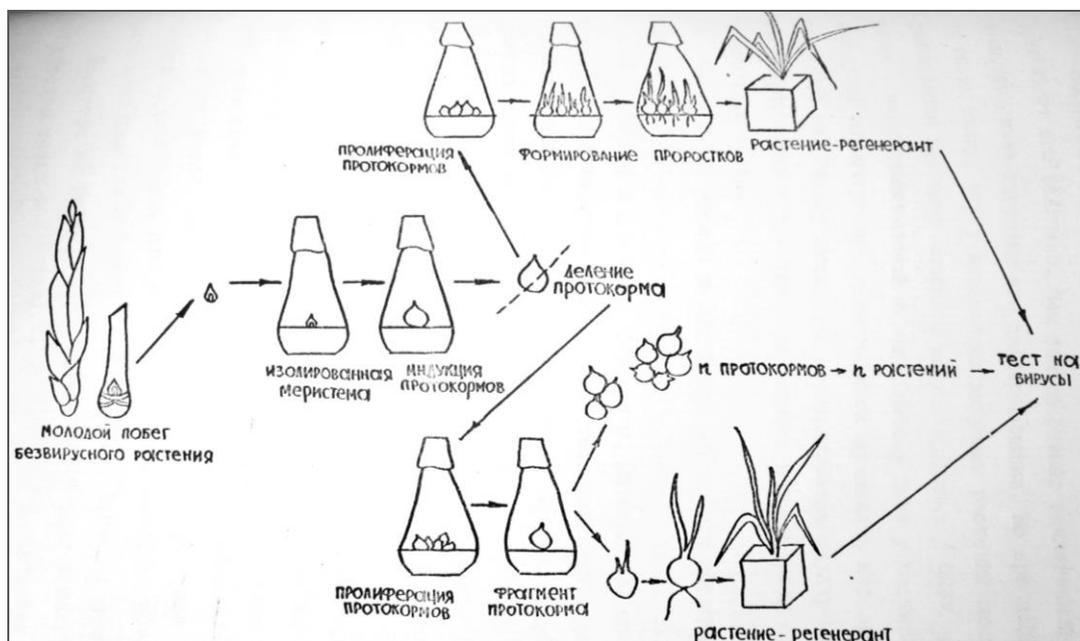


Рис. 8 Биотехнологическая схема клонального микроразмножения цимбидиума  
Fig. 8 Biotechnological scheme of *Cymbidium hybridum* clonal micropropagation

**Условия культивирования меристематических тканей, протокормов и регенерантов.** Изолированные меристемы культивируют в условиях постоянной температуры 24-25°C и освещенности 1-2 клк. Это объясняется наличием углеводов в питательной среде. С увеличением активности регенерации нарастает потребность в интенсивности освещения до 3 клк с фотопериодом 14-16 ч. Свет необходим для регуляции морфогенетических процессов, особенно на начальной стадии для формирования микропобегов и корнеобразования.

Влажность воздуха помещения не имеет значения, так как в изолированной микросреде (колбы, покрытые фольгой) она поддерживается на оптимальном уровне.

Для увеличения количества протокормов их необходимо ежемесячно отделять и пересаживать на свежеприготовленную среду. Каждый протокорм за месяц может образовать до 8 новых протокормов. Если протокорм вовремя не разделить, то происходит дифференциация примордиальных листьев. После образования 1-2 листьев у основания протокорма спонтанно дифференцируется корень. Поэтому для более интенсивного образования новых протокормов деление их необходимо проводить до дифференциации первого листа. Нельзя допускать и перерастания протокормов: занимая всю поверхность среды, они начинают угнетать друг друга и желтеть, что отрицательно сказывается на их дальнейшей регенерации. Культивирование протокормов и побегов желательно проводить в конических колбах или банках объемов 250 мл и более.

Таким образом, делением протокормов поддерживают их рост длительное время и получают желаемое количество регенерантов. Как показали наши исследования, этот процесс не бесконечный. Через 1,5-2 года необходимо обновление протокормов за счет

нового цикла вычленения меристематических тканей и т.д., так как длительные пассажи истощают культуру и резко ухудшается качество выращиваемых регенерантов.

**Адаптация регенерантов *in vivo*.** Ответственным этапом технологии культивирования цимбидиума является пересадка регенерантов в условия естественного автотрофного питания. Это связано с тем, что их корневая система еще не приспособлена к самостоятельному извлечению питательных веществ из почвенного субстрата.

Растения на расстоянии 1-2 см друг от друга высаживают в смесь сфагнового мха, торфа и перлита с добавлением полистирола в пластмассовые вазоны и выставляют на стеллаж ускоренного выращивания растений. Оптимальная температура для их культивирования – 22-25°C. Для высадки отбирают растения с 2-3 хорошо развитыми листьями и 3-4 корнями. Субстрат уплотняют, растения поливают и помещают в укрытия типа «пленочный туннель». Через 5-7 суток туннель с растениями начинают проветривать с тем, чтобы поддерживать влажность на уровне 90-95%. Через неделю растения начинают поливать, поддерживая непрерывную влажность субстрата в пределах 60-70%. Как только у молодых растений смыкаются листья (через 3-5 мес. После посадки), их пересаживают. Самые сильные и здоровые растения с хорошо развитой корневой системой пересаживают в вазоны диаметром 9-11 см. В этих вазонах растения, как правило, находятся 8-10 месяцев. Затем, когда субстрат истощается и корневая система разрастается, растения переваливают в вазоны диаметром 13-15 см. Если корни прирастают к стенкам вазона, то его осторожно разбивают и растения с черепками, к которым приросли корни, высаживают в большой вазон. В качестве субстрата используют смесь из верхового торфа, лесной подстилки фундука или лучше – листьев бука, коры сосны (1:1:1). Данный субстрат обеспечивает хорошие результаты, поскольку гарантирует необходимую аэрацию корневой системы и стабильную структуру в течение 2-3 лет. Добавление верхового торфа, обладающего высокой буферной способностью, обеспечивает стабилизацию реакции среды почвенного субстрата на требуемом уровне, а введение лесной подстилки позволяет поддерживать необходимый уровень влажности. Деструкция листьев и коры удовлетворяет начальные потребности растений в питании. Кроме того, все компоненты субстрата легко доступны в наших условиях.

Первое цветение цимбидиума после пересадки регенеранта в естественные условия наблюдается через 3 года (рис. 9).

**Ретестирование меристемных растений и их репродукций на вирусы.** Повторное тестирование растений на вирусы проводится с одновременной проверкой сортотипа и качества соцветий. При массовом промышленном выпуске безвирусного посадочного материала цимбидиума главное внимание должно быть сосредоточено на первом тестировании; повторное можно осуществлять выборочно (25%). Ретестирование аналогично методу, описанному выше.

**Создание суперэлитных маточных посадок.** Как было отмечено, безвирусный посадочный материал цимбидиума начинает зацветать через 3 года после пикировки в естественный субстрат. Такие растения целесообразно использовать для закладки маточных посадок и как исходный материал для массового тиражирования безвирусного материала.

Приемы и методы выращивания безвирусных маточников цимбидиума не отличаются от выращивания обычных маточников, за исключением более жесткого фитовирусологического контроля. Совершенно недопустимо появление в теплице тлей и клещей, являющихся переносчиками вирусов.

Полученные безвирусные сорта цимбидиума в течение 5 лет остаются свободными от вторичной инфекции, что подтверждается ежегодным тест-методом ИФА. Растения цимбидиума дважды цвели за этот период.



Рис. 9 Цветущие растения орхидеи *Cymbidium hybridum*  
 Fig. 9 Flowering *Cymbidium hybridum* plants

**Биотехнология получения и клонального микроразмножения в культуре органов и тканей безвирусного посадочного материала антуриума Андрэ (*Anthurium andreaenum* Lind.).** Антуриум Андрэ в настоящее время широко используется как в озеленении, так и в срезочной культуре (рис. 10). Промышленное выращивание антуриума Андрэ сдерживается рядом причин, прежде всего – низкой продуктивностью растений при вегетативном размножении (деление куста позволяет получить 6-8 растений в год) и значительной гетерогенностью семян при семенном размножении. Одним из перспективных путей массового размножения антуриума Андрэ является метод культуры ткани *in vitro* [21, 30, 38], который способствует значительному повышению коэффициента размножения растений при высоком качестве соцветий. Однако применение этого метода сопряжено с определенными трудностями, обусловленными распространением и вредоносностью вирусных болезней. Нашими исследованиями показано, что из высечек листа больного исходного растения в условиях *in vitro* вырастают зараженные вирусами регенеранты [16, 21].

На растениях антуриума Андрэ в условиях закрытого грунта нами обнаружено два вирусных заболевания – мозаика антуриума (*Arabis mosaic nepovirus*, ArMV + *Dasheen mosaic potyvirus*, DsMV + *Cucumber mosaic cucumovirus*, CMV) (рис. 11) и огуречная мозаика (*Cucumber mosaic cucumovirus*).

Этапы биотехнологии (рис. 12):

Тестирование и отбор безвирусных растений;

Стерилизация органов и тканей и введение первичного экспланта на питательную среду с добавлением вирицида;



Рис. 10 Цветущие растения *Anthurium andreanum*  
Fig. 10 Flowering *Anthurium andreanum* plants



Рис. 11 Симптомы мозаики (*Arabis mosaic nepovirus*, ArMV + *Dasheen mosaic potyvirus*, DsMV + *Cucumber mosaic cucumovirus*, CMV) на листьях антуриума Андрэ  
Fig. 11 Mosaic symptoms (*Arabis mosaic nepovirus*, ArMV + *Dasheen mosaic potyvirus*, DsMV + *Cucumber mosaic cucumovirus*, CMV) on the leaves of *Anthurium andreanum*

Приготовление питательных сред ;

Условия культивирования эксплантов, индукция и пролиферация каллуса;

Регенерация микропобегов и растений *in vitro*;

Адаптация регенерантов *in vivo*;

Ретестирование растений, выращенных *in vitro*, на отсутствие вирусов.

**Отбор исходного растительного материала и тестирование на вирусы.** При отборе исходных растений проводят визуальный осмотр генотипов. Затем в специально предназначенной теплице проводят тесты на травянистых растениях-индикаторах для определения наличия вируса и его концентрации. Материалом для индексации служат высежки ткани листа (1 см), которые растирают в ступке с добавлением фосфатного или боратного буфера в соотношении 1:3 или 1:5. Состав фосфатного буфера: а –  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  в количестве 17,8 г/л и б –  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 13,61 г/л; после их растворения готовится 0,1М смесь, pH 7,0: а – берется 612 мл и б – 388 мл + 0,1% раствор  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  1,0 г/л. Состав боратного буфера: а-  $\text{H}_3\text{BO}_3$  в количестве 12,37 г/л растворяют и добавляют 100 мл 1н. NaOH; б – 0,1 н. HCl. Состав 0,1М смеси, pH 8,0: берется а – 558 мл + б – 441 мл + 1% раствор  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  (+10 г/л). Для приготовления 1 н. раствора NaOH требуется вещества 39,997 г/л, 0,1 н. HCl 8,08 мл/л. Полученный гомогенат наносят на опудренные карборундом листья растений-индикаторов. Симптомы на растениях-индикаторах *Datura stramonium* L. И *Cucumis sativus* L. 'Delikatess' проявляются обычно через 7-14 дней в виде желтоватых пятен на натертых листьях. Наряду с

биологическим проводят серологический тест методом ИФА. Если безвирусных растений не обнаружено, для оздоровления проводят хемотерапию эксплантов *in vitro*.

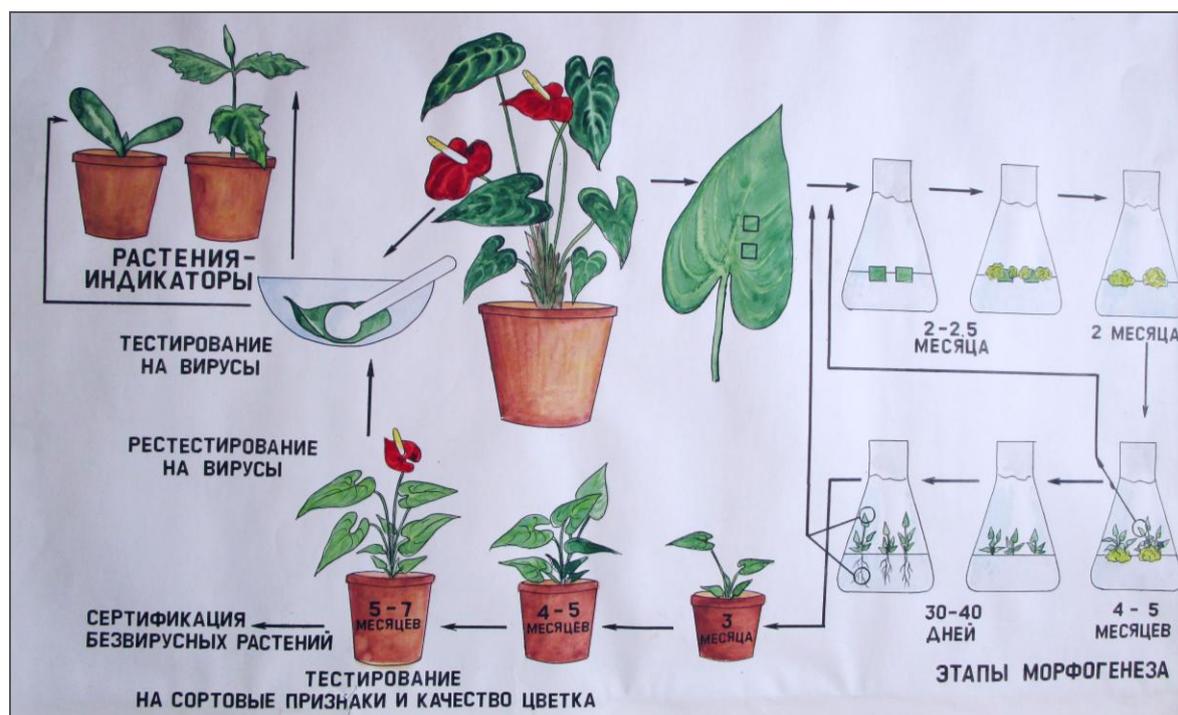


Рис. 12 Биотехнологическая схема получения и клонального микроразмножения безвирусного посадочного материала *Anthurium andreanum*

Fig. 12 Biotechnology scheme of obtaining and clonal micropropagation of virus-free planting material in *Anthurium andreanum*

Максимальным морфогенным потенциалом (100%) обладают экспланты *Anthurium andreanum* "Porzellan". Активная пролиферация каллуса и последующий органоогенез протекает у них в течение всего года. В то время как процесс каллусообразования и морфогенез у *A. andreanum* "Iga-Gold" прямо пропорциональны физиологическому состоянию растения и возрасту листа. Морфогенный потенциал у эксплантов этого сорта составляет всего 10-30%. В связи с этим наиболее целесообразно использовать в качестве источника эксплантов молодые листья 1,5-2-летних растений *A. andreanum* "Iga-Gold" с апреля по сентябрь, поскольку в это время в растениях накапливается большое количество эндогенных регуляторов роста, способствующих более интенсивному каллусогенезу.

**Стерилизация органов и тканей и вычленение экспланта.** В качестве источников эксплантов отбирают молодые листья (2-3-недельного возраста в период разворачивания и антоциановой окраски) и початки в стадии трубки, когда они закрыты прицветником – «покрывалом».

Листья и початки, после того, как их срезали с исходного растения, промывают водой. Затем материал стерилизуют, в результате он освобождается от сапрофитной микрофлоры. Применяют ступенчатую стерилизацию, то есть обработку несколькими стерилизующими агентами поочередно.

Стерилизацию материала осуществляют в асептических условиях. Листья и початки опускают на 30 секунд в 70% этиловый спирт, затем промывают в стерильной дистиллированной воде и погружают в 1-2% гипохлорит натрия (NaClO) с добавлением 1-2 капель детергента (Tween-80). Продолжительность стерилизации зависит от типа

экспланта и длится 5-10 мин для листа и 10-15 мин – для початка. Затем экспланты промывают пятикратно в стерильной дистиллированной воде и помещают в чашки Петри.

После стерилизации ткань листа размером 0,5-1,0 см<sup>2</sup> вычлняют по обе стороны вдоль центральной жилки, используя и основание черешка. У тканей, взятых по периферии листа, индукцию каллуса не наблюдают. В качестве экспланта из початка берут диски или сегменты толщиной 2-3 мм. Для вычленения ткани применяют скальпели или лезвия. Экспланты помещают горизонтально в пробирки или колбы на агаризованную питательную среду.

**Приготовление питательных сред.** Важнейшим фактором успешной индукции и культивирования каллуса, пролиферации адвентивных почек и получения полноценных регенерантов является состав питательной среды. Для размножения растений из высечек листа антуриума в условиях *in vitro* используют питательные среды Pierik [62], Novak, Nepustil [59] (табл. 6).

Таблица 6

Составы питательных сред для культивирования каллуса и регенерантов из высечек листа антуриума Андрэ, мг/л

Table 6

Compounds of culture media for callus cultivation and obtaining of the *Anthurium andreanum* regenerants from leaf cutting, mg l<sup>-1</sup>

Компоненты	Среда 1 индукция каллуса	Среда 2 культивирование каллуса	Среда 3 пролиферация адвентивных почек и проростков	Среда 4 ризогенез
<u>Макроэлементы</u>				
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825,0	825,0	206,0	412,0
KNO <sub>3</sub>	950,0	950,0	950,0	475,0
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440,0	220,0	220,0	110,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370,0	185,0	185,0	92,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85,0	85,0	85,0	42,0
<u>Fe-хеллат</u>				
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	37,3	37,3	37,3
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	27,8	27,8
<u>Микроэлементы</u>				
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2	6,2	6,2
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22,3	22,3	22,3	22,3
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6	8,6	8,6
KJ	0,83	0,83	0,83	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25	0,25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025	0,025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025	0,025
<u>Органические вещества</u>				
Никотиновая кислота	0,5	0,5	0,5	0,5
Пиридоксин·HCl	0,5	0,5	0,5	0,5
Тиамин·HCl	0,4	0,4	0,4	0,4
Мезоинозит	100,0	100,0	100,0	100,0
БАП	1,0	1,0	1,0	-
2,4-D	0,2	-	-	-
ИМК	-	-	-	0,5
Кинетин	-	-	0,5	-
Глюкоза	30000,0	20000,0	-	-
Сахароза	-	-	20000,0	30000,0
Агар	8000,0	8000,0	8000,0	8000,0
pH 5.9-6.0				

Для культивирования изолированных эксплантов початка используют модифицированную питательную среду Geier и Reuther [39] (табл. 7).

Таблица 7  
Состав питательной среды для индукции каллусогенеза и культивирования растений, полученных из початка антуриума Андрэ

Table 7  
Compounds of culture medium for callusogenesis induction and plants cultivation, obtained from spadix of *Anthurium andreanum*, mg l<sup>-1</sup>

Компоненты	Концентрация, мг/л
KNO <sub>3</sub>	950,0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	100,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	185,0
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	220,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68,0
<u>Fe-хеллат</u>	
Na <sub>2</sub> EDTA	27,85
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	37,25
<u>Микроэлементы</u>	
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	19,0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10,0
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10,0
KJ	0,83
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025
<u>Органические вещества</u>	
Глицин	2,0
Пиридоксин·HCl	0,5
Тиамин·HCl	0,5
Фолиевая кислота	0,5
Биотин	0,05
БАП	1,0
2,4-D	0,1
Сахароза	20000,0
Агар	8000,0
pH 5.9-6.0	

Готовят питательные среды на дистиллированной воде. Для удобства и сокращения затрат времени на приготовление питательных сред обычно используют маточные растворы солей, которые представляют собой концентрированные растворы. Обычно готовят отдельно растворы макро- и микросолей, солей кальция (так как кальций вместе с фосфатами образует осадок) и раствор хелатов. Маточные растворы витаминов и регуляторов роста готовят на этиловом спирте из расчета 1 мг вещества на 1 мл раствора. При этом цитокинины вначале растворяют в 0,1 н. растворе NaOH или KOH, а затем в спирте. Маточные растворы хранят при температуре 3-4°C.

Следует отметить, что от правильного приготовления питательной среды зависит успех всего технологического процесса. Поэтому важно при взятии навески обращать внимание на чистоту («чда») и формулу химического соединения (безводная или кристаллизационная с водой) и в случае необходимости делать соответствующие перерасчеты. Стерилизацию питательных сред проводят в автоклаве при 0,8 атм в течение 10-15 мин.

Приготовленную среду желательно использовать в течение 15 суток. Для этого ее помещают в холодильную камеру с температурой 2-4°C. При более длительном

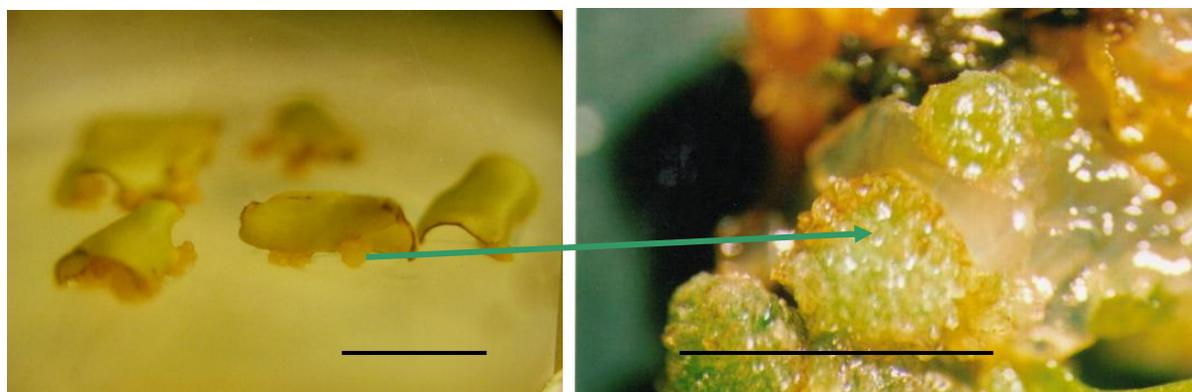
хранении среда начинает «портиться», происходит разложение физиологически активных веществ и подсыхание. Перед использованием питательной среды, хранившейся в холодильной камере, штативы вынимают заранее, чтобы температура сравнялась с температурой окружающей среды.

**Условия культивирования эксплантов, индукция и пролиферация каллуса.**

Для индукции каллуса и его роста колбы или пробирки помещают в термостат со среднесуточной температурой 25-26°C (в условия темноты). Через 2-2,5 мес. По периметру экспланта формируется плотный, светло-желтый каллус.

Однако не все изолированные на среду 1 высежки листа и сегменты початка способны индуцировать каллус. Причиной, возможно, является физиологическое состояние ткани, а в отдельных случаях – действие дезинфицирующего вещества. Активность индукции каллусообразования часто зависит от генотипа и возраста листа. У антуриума Андрэ с розовой окраской покрывала активность индукции каллусообразования выражена сильнее. Ткани эксплантов, изолированные в фазу разворачивания листа, в период активного роста исходного растения с красным покрывалом (сорт Iga-Gold), менее активно индуцируют каллус (около 50%).

Мы заметили, что активность индукции каллуса усиливается при концентрации 2,4-D до 0,2 мг/л в сочетании с 1,0 мг/л БАП. Культивирование каллуса продолжается около 2-3 месяцев. В процессе роста каллус имеет шарообразную форму, желтый или желтовато-розовый цвет (рис. 13 а, б). В отдельных случаях и на среде 2 отмечают появление микропобегов. Для дальнейшей регенерации адвентивных почек и микропобегов каллус разделяют на отдельные части размером 0,5-1,0 см и помещают на среду 3, на которой в течение 4-5 мес. Увеличивается количество микропобегов (рис. 14). Добавление в среду 3 кинетина в количестве 0,5 мг/л улучшает состояние микропобегов, способствуя их 100% укоренению при пикировке.



а (a)

б (b)

**Рис. 13** Каллусообразование в культуре листовых эксплантов антуриума Андрэ: а) формирование каллуса по краю высежки листа; б) каллус (масштаб 1 см)

**Fig. 13** Callusogenesis in leaf culture of *Anthurium andreanum*: а) callus formation at margin of leaf cutting; б) callus (Bar 1 cm)

При пересадке проростков на среду 4 часть листьев и корней обычно обрывается. Использование их для индукции каллуса, возвращая на среду 1, оказалось весьма эффективным. После среза микропобегов оставшийся каллус пассируют на среду 3 для повторной пролиферации адвентивных почек.

**Регенерация микропобегов и растений *in vitro*.** В процессе клонального микроразмножения при культивировании эксплантов на искусственных питательных средах возникает необходимость в периодических пересадках эксплантов на свежие

среды. Это вызвано истощением питательной среды вследствие выноса ими питательных веществ в процессе развития.

Кроме этой причины, касающейся взаимодействия экспланта и питательной среды в процессе культивирования, необходимость пересадок вызвана нарастанием объема растительного материала в культуральном сосуде. В процессе клонального микроразмножения сформировавшиеся конгломераты каллуса и микропобегов требуют периодического разделения и рекультивирования. Длительность между пассажами в среднем составляет 3-6 недель и зависит от скорости размножения.



**Рис. 14** Массовое образование микропобегов из каллуса листового происхождения антуриума Андрэ сорта Iga-Gold

**Fig. 14** Mass microshoots formation from originally leaf callus of *Anthurium andrea* cv. Iga-Gold

Продолжительность регенерации микропобегов на среде 3 составляет 4-5 мес. За этот период из каллусной ткани размером 1,5-2,0 см формируется до 70 микропобегов и отмечается спонтанное корнеобразование (рис. 15). Поэтому каллус помещают в стеклянные сосуды емкостью 0,5 л для активной пролиферации и роста микропобегов в высоту. Вполне сформировавшиеся растения, минуя среду 4, высаживают в вазоны, что сокращает технологический цикл. Каллус, оставшийся после отделения побегов, проявляет способность к регенерации на свежеприготовленной среде 3 до четырех пассажей, затем он отмирает. Отделенные побеги пикируют на среду 4, где они укореняются в течение 30-40 сут, добавление к этой питательной среде ИМК в концентрации 0,5 мг/л ускоряет ризогенез до 2-3 недель и способствует 100% укореняемости.

Следует отметить, что у большинства эксплантов часто происходит спонтанное образование побегов и корней уже на среде 2. Это значительно сокращает цикл регенерации растений, исключает дополнительные пересадки и удешевляет метод. Значительно увеличивает коэффициент размножения черенкование полученных *in vitro* растений антуриума с их последующим укоренением. Для этого побеги извлекают из колб и делят на части так, чтобы каждая из частей имела не менее одного листа, затем их помещают на питательную среду. Через 3-4 недели из пазухи листа образуется 1 (иногда 2-3) побега. Укоренение происходит спонтанно на той же среде.

Часто у основания побегов антуриума, заглубленных в агар, пролиферирует каллус, имеющий многочисленные листовые розетки. Через 1,5-2 мес. Из них формируются побеги. Следовательно, 1 микропобег может быть источником получения множества новых адвентивных побегов, которые в свою очередь также используют для

увеличения коэффициента размножения. Таким образом, используя различные методы культуры *in vitro*, за 9 мес. Можно увеличить количество получаемого безвирусного посадочного материала антуриума Андрэ в 100 и более раз.



Рис. 15 Спонтанное укоренение микропобегов антуриума Андрэ  
Fig. 15 *In vitro* spontaneous rooting of microshoots in *Anthurium andreanum*

**Адаптация регенерантов *in vivo*.** Миниатюрные растеньица 2-4 см высотой с 1-3 листьями с хорошо сформированной корневой системой пикируют в пластмассовые вазоны размером 7 x 6,5 см со смесью торфа и перлита в соотношении 2:1. В каждый вазон высаживают 3-4 растеньица (рис. 16). При посадке растения разделяют на крупные, средние и мелкие. Первые 5 дней после посадки растения только опрыскивают водой, а в дальнейшем умеренно поливают. Спустя две недели после пикировки осуществляют жидкую подкормку раствором Кнопа [47] и повторяют ее через каждые три недели. Укоренение регенерантов происходит в течение 15-30 дней. После укоренения стебель вытягивается, из 6-8 междоузлия появляются пучок корней и 2-3 типичных листа.



Рис. 16 Регенеранты антуриума Андрэ в условиях адаптации *in vivo*  
Fig. 16 *In vivo* adaptation of *Anthurium andreanum* regenerants

Растения содержат в помещении доращивания при температуре 23-25°C с освещенностью 3-5 клк, влажностью 90-95% и 16-часовом фотопериоде в течение 4 месяцев.

**Перевалка в вазоны и условия содержания растений в теплице.** Через 4 месяца со дня пикировки делают первую пересадку растений в вазоны размером 8 x 9 см (рис. 17 а). В качестве субстрата используют торф, перлит, перегной и грубые фракции (керамзит) в соотношении 3:1:1:0,5 соответственно при рН 5,5. В дальнейшем увеличивают грубую фракцию. Для подкормок используют раствор Кнопа и микроэлементы по Heller [41]. Содержат растения в теплицу при температуре 20°C.

Растения нормально развиваются, появляется много дополнительных побегов (от одного пересаженного из пробирки в субстрат растения появляется к этому времени до 4-5 новых). Способствует этому, видимо, продолжающееся действие регуляторов роста (БАП). Спустя 6 мес. Делают вторую перевалку в вазоны размером 14,5 x 15 см с тем же субстратом. Растения содержат в прежнем режиме. В этот период проводят наблюдения и учет за качеством соцветия, соответствия генотипу и повторно тестируют на вирусы.



Рис. 17 Адаптированные растения антуриума Андрэ в условиях теплицы: а) через 4 месяца выращивания; б) через 18 месяцев выращивания  
 Fig. 17 Adapted *Anthurium andreaeanum* plants in greenhouse: a) after 4 month of growing; b) after 18 month of growing

Первое цветение отмечают спустя 18 месяцев от начала индукции каллуса или через 8-9 мес. После пикировки из пробирки в субстрат; у отдельных растений за этот период появляется 1-3 соцветия (рис. 17 б). Главным условием содержания полученных *in vitro* регенерантов и выращивания их в теплице является отсутствие тлей и других насекомых.

**Ретестирование растений, выращенных *in vitro*, на отсутствие вирусов.** Ретестирование растений на вирусы проводят одновременно с проверкой сортотипа и качества соцветия. Техника тестирования аналогична описанной в первом этапе технологии. При массовом промышленном выпуске безвирусного материала антуриума Андрэ главное внимание должно быть уделено как первому тестированию, так и ретестированию.

**Биотехнология получения и размножения безвирусного посадочного материала розы (*Rosa sp.*).** Розы занимают одно из ведущих мест в экономике промышленного цветоводства. Однако их выращивание сопряжено с рядом трудностей: поражаемость вирусными болезнями, низкий коэффициент размножения. Вопрос размножения розы в условиях *in vitro* рассматривался рядом авторов [2, 36, 37].

На розе известно 14 возбудителей вирусных болезней. В Восточно-европейских странах наиболее распространены и вредоносны вирусы, объединенные в комплекс мозаик (Complex mosaic): *Rose mosaic virus* (RMV) вызывает светло-зеленые пятна,

кольца и линии на листьях, мелкие и асимметричные цветы; *Rose yellow mosaic virus* (RYMV) – дуболистный узор на листьях, полукольца и линии, иногда становятся заметны желтые продолговатые пятна. В последние годы часто встречается вирус пестролепестности розы (*Rose flower colour break tobamovirus*). Аналогичные вирусы выявлены и в Крыму (рис. 18).



Рис. 18 Внешние признаки поражения розы садовой вирусом пестролепестности (*Rose flower colour break tobamovirus*)

Fig. 18 Symptoms of *Rose flower colour break tobamovirus* in flower of *Rosa* sp/

Предлагаемая биотехнология получения и размножения безвирусного посадочного материала розы декоративной показана на рисунке 19.

**Отбор и тестирование растений на вирусы.** Выявление вирусов проводится по единой комплексной системе, включая визуальную оценку исходного материала по внешним признакам болезни; биотест на растениях-индикаторах *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium amaranticolor*, *Vigna sinensis* L.; электронную микроскопию и метод иммуноферментного анализа.

Безвирусные растения розы включают в размножение *in vitro* с последующим фитовирусологическим контролем (ретестирование). Поражаемые вирусами растения ценных сортов вводят в культуру *in vitro* и подвергают термо- или хемотерапии *in vitro*.

**Стерилизация и отбор оптимального экспланта.** Перед стерилизацией цветоносы в период окрашивания бутонов и побеги с вегетативными почками промывают проточной водой. Каждый побег делят на части с одной почкой и помещают в стеклянный сосуд для дезинфекции. Вначале растительный материал в течение 1 мин. стерилизуют в 70% этаноле, затем помещают в раствор 0,08% нитрата серебра, добавляя в обоих случаях по 2 мл детергента Tween-80. Продолжительность стерилизации – от 2 до 5 мин., в зависимости от онтогенетических особенностей исходного материала. После 4-5-кратной промывки в стерильной дистиллированной воде материал готов для введения в культуру *in vitro*. Все последующие операции по извлечению экспланта и изолированию его на питательную среду осуществляют в ламинарных боксах.

Исследования показали, что оптимальными эксплантами для получения безвирусного суперэлитного материала розы и последующего его размножения служат меристематические ткани и вегетативные почки с микроцитком здоровых растений. Важно отметить, что меристематические ткани следует вычленять из вегетативных почек, а почки с микроцитком – с цветоноса в период окрашивания бутона. В противном случае выращенные *in vitro* регенеранты могут иметь аномальные отклонения.

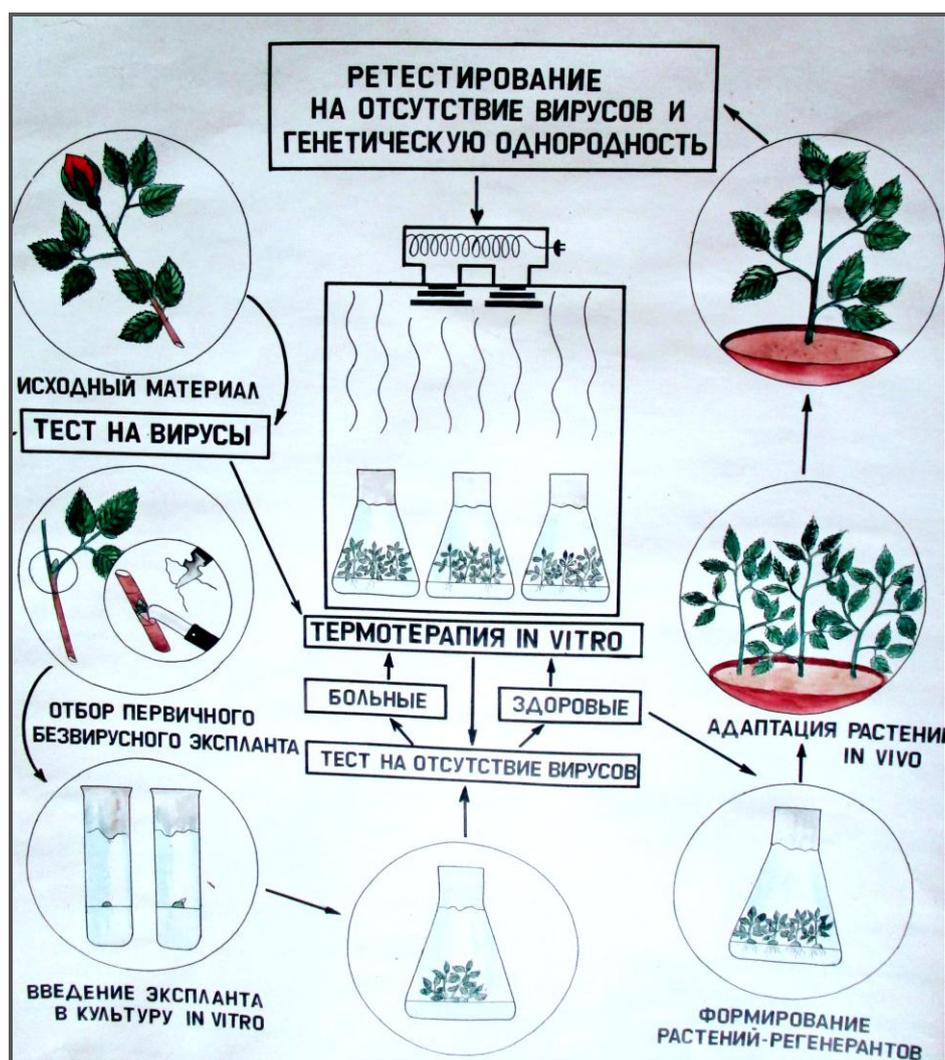


Рис. 19 Биотехнологическая схема оздоровления и клонального микроразмножения розы садовой  
 Fig. 19 Biotechnology scheme of improvement and clonal micropropagation of *Rosa sp.*

**Питательные среды.** Важным фактором успешного клонального микроразмножения розы и получения полноценных регенерантов является состав питательной среды, включающий минеральные соли, витамины, углерод, аминокислоты и регуляторы роста (табл. 8). От качественного приготовления питательных сред зависят процессы морфогенеза и органогенеза.

Таблица 8

Составы питательных сред для клонального микроразмножения розы, мг/л

Table 8

Compounds of culture media for *Rosa sp.* clonal micropropagation, mg l<sup>-1</sup>

Компоненты	Дифференциация меристематических тканей и начало пролиферации	Пролиферация и размножение	Ризогенез
1	2	3	4
<u>Макроэлементы</u>			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,0	1650,0	825,0
KNO <sub>3</sub>	1900,0	1900,0	950,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,0	170,0	85,0
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440,0	440,0	220,0

Продолжение таблицы 8

1	2	3	4
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370,0	370,0	185,0
<u>Fe-хеллат</u>			
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	37,3	37,3
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	27,8
<u>Микроэлементы</u>			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2	6,2
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22,3	22,3	22,3
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6	8,6
KJ	0,83	0,83	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025
<u>Органические вещества</u>			
Никотиновая кислота	0,5	0,5	-
Пиридоксин·HCl	0,5	0,5	-
Тиамин·HCl	1,0	1,5-2,5	-
Рибофлавин	0,1	0,1	-
Ca-пантотенат	0,5	-	-
L-глутамин	0,5	-	-
Мезоинозит	100,0	40,0	-
Аденинсульфат	10,0	-	-
НУК	0,02	0,25	1,0
ИМК	-	-	1,0
БАП	0,5	1,0-1,5	-
Сахароза	30000,0	30000,0	30000,0
Агар	7000,0	7000,0	7000,0
pH 5,7			

Техника и последовательность приготовления питательных сред нами подробно изложены в начале раздела.

**Условия культивирования эксплантов.** Развитие эксплантов успешно протекает в культуральной комнате при температуре 23°C, 14-часовом фотопериоде и освещенности 2-3 клк.

Индукцию пролиферации адвентивных побегов при данных условиях отмечают спустя 5 дней от начала введения экспланта в питательную среду. Наиболее интенсивную пролиферацию пазушных побегов мы наблюдали у сортов с красной и розовой окраской лепестков цветка (рис. 20).

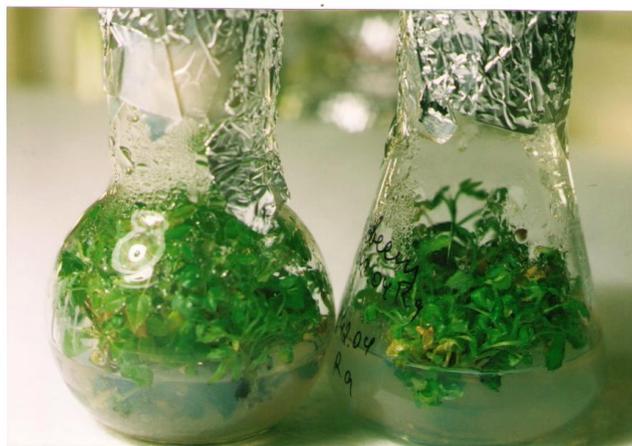


Рис. 20 Массовое побегообразование розы садовой *in vitro*  
 Fig. 20 Mass shoot formation of *Rosa sp. in vitro*

Коэффициент размножения у сортов Звезда Октября, Коралловый Сюрприз достигал 1:7, у других – 1:5.

Определяющими факторами культивирования регенерантов являются температура и освещенность. Развитие эксплантов успешно протекает при температуре 23°C, 14-часовом фотопериоде и освещенности 2-3 клк. Удлинение фотопериода отрицательно сказывается на состоянии многочисленных побегов. Они хлорозят, листья осыпаются. Аналогичные изменения происходят и при температурном перепаде.

**Термо- и хемотерапия *in vitro*.** В случае необходимости размножения *in vitro* ценных сортов, зараженных вирусами проводится термо- или хемотерапия.

Для термотерапии *in vitro* используют побеги и регенеранты, полученные в культуре из одной почки. Замечено, что побеги (проростки) розы *in vitro* менее реагируют на экстремальные условия высоких температур (37°C) в термокамере, где они находятся в течение 5 недель. После термо- или хемотерапии побеги пассируют на свежеприготовленную питательную среду.

Спустя 4 недели проводится тестирование на отсутствие вирусов по методике, описанной выше.

Доказано, что после термотерапии *in vitro* вирусы в тканях розы отсутствуют. Ретестирование проводят через 2 мес. После адаптации растений *in vivo*.

**Ризогенез.** Специфика ризогенеза заключается в том, что у одних сортов, как Климентина, Селена, Коралловый Сюрприз, для индукции ризогенеза необходимо присутствие в питательной среде одновременно двух ауксинов: НУК в концентрации 0,5 мг/л и ИМК – 1 мг/л. У других сортов – Звезда Октября, Кри-Кри, Роял Хагнз – спустя 2-3 недели появляется хорошо развитая корневая система, если в питательную среду вводят один из указанных ауксинов в концентрации 2,0 мг/л (рис. 21).



Рис. 21 Ризогенез розы садовой *in vitro*  
Fig. 21 Rhizogenesis of Rose *in vitro*

Ризогенез протекает лучше, если культуральные сосуды с растениями находятся при более низких температурах (8°C) и освещенности 0,8-1 клк.

Так образом, нами разработан оригинальный способ клонального микроразмножения безвирусного материала розы садовой в условиях *in vitro* (рис. 22), который позволяет из одной вегетативной почки получить неограниченное число побегов и регенерантов.

**Адаптация *in vivo* и содержание растений.** Регенеранты с хорошо сформированной корневой системой (получают за 3-4 мес.) пикируют в вазоны

емкостью 0,25 л, наполненные смесью торфа и перлита в соотношении 1:1. Затем их помещают под пленочные укрытия на 10-12 сут и устанавливают на СУВР. В период адаптации поддерживается температура 23-25°C, освещенность 2-3 клк, фотопериод 16 час. В течение 3-4 недели растения адаптируются.

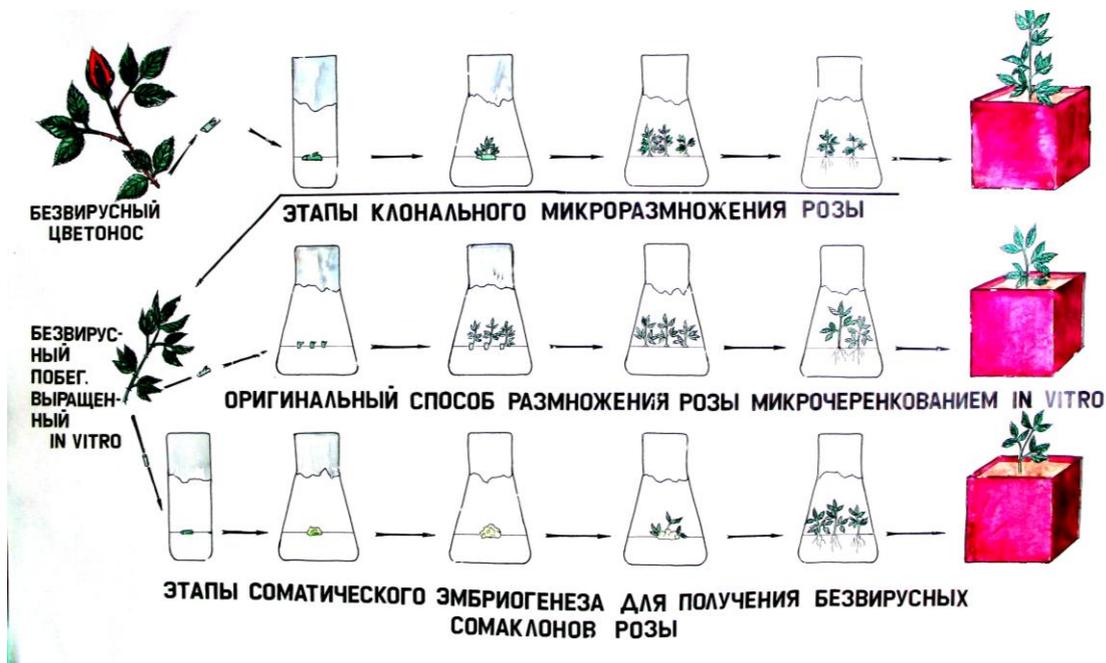


Рис. 22 Схема размножения безвирусных растений розы садовой в условиях *in vitro*  
 Fig. 22 Scheme of *Rosa sp.* virus-free plants propagation *in vitro*

**Ретестирование растений.** Повторная проверка на отсутствие вирусов осуществляется по общепринятой схеме (описанной в начале технологии) с использованием, прежде всего, наиболее чувствительных методов (ИФА, ПЦР-анализ)..

Проводят ретестирование через 2 мес. После адаптации регенерантов. В наших условиях все полученные и размноженные растения были здоровыми.

От момента изолирования ткани исходного растения до получения кондиционного безвирусного посадочного материала проходит, в зависимости от времени года и сортовых особенностей, 6-7 мес. Такие растения вскоре зацветают. Растения и цветы обладают высокими качественными показателями (рис. 23).



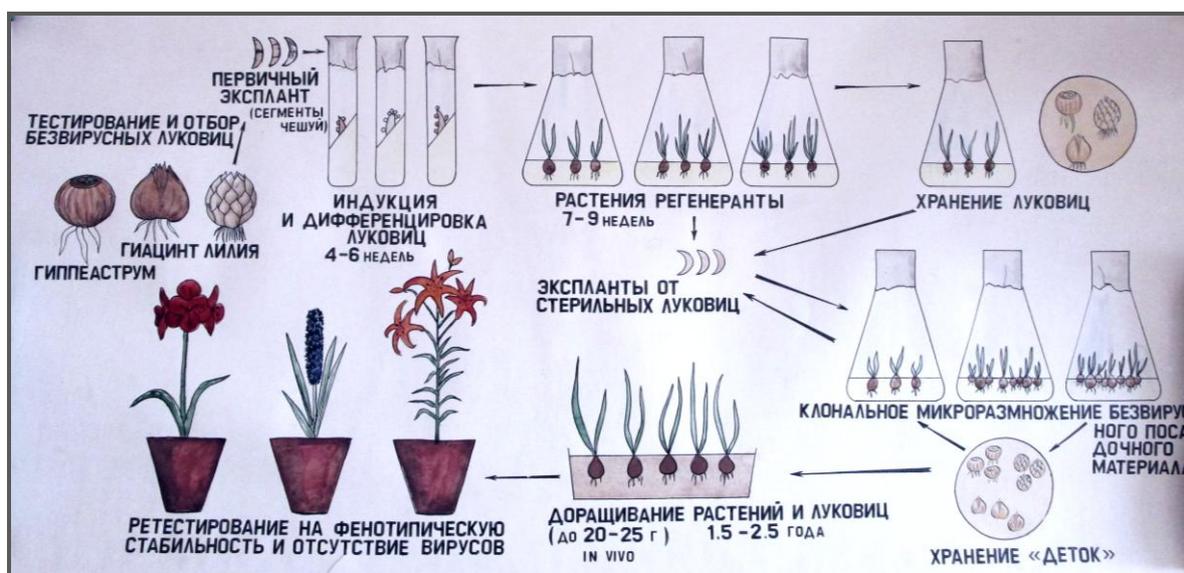
Рис. 23 Цветущие растения розы  
 Fig. 23 Flowering *Rosa sp.* plants

**Биотехнология получения и клонального микроразмножения в культуре органов и тканей безвирусного посадочного материала лилии (*Lilium L.*), гиацинта (*Hyacinthus Taurin.*) и гиппеаструма (*Hippeastrum Herb.*). Известно несколько путей получения безвирусных клонов: отбор здоровых растений внутри имеющихся посадок и их размножение, оздоровление пораженных вирусами растений с применением методов термотерапии и культуры меристемы. К сожалению, термотерапия не для всех культур оказывает положительный эффект, так как обрабатываемый исходный материал, особенно луковицы, не выдерживают условий высоких температур.**

Культура органов и тканей является одним из важнейших направлений биотехнологии, являющимся эффективным способом сохранения и воспроизведения растений желаемых генотипов. Эти генотипы могут быть исходными формами для селекции, новыми перспективными сортами или редкими исчезающими видами.

Наряду с сохранением генетической однородности сорта при массовом размножении безвирусного материала, можно создать и получить в условиях *in vitro* необходимое количество посадочного материала. Однако первостепенной задачей такого размножения является, прежде всего, поиск и отбор безвирусных и свободных от других патогенов исходных экземпляров растений.

На основании проведенных многолетних исследований разработана и уточнена биотехнология получения безвирусного посадочного материала лилии, гиацинта и гиппеаструма (рис. 24).



**Рис. 24 Биотехнология массового размножения безвирусного посадочного материала лилии, гиацинта, гиппеаструма**

**Fig. 24 Biotechnology of mass propagation of virus-free planting material of lily, hyacinth, hippeastrum**

Лилия относится к одной из сильно поражаемых вирусами цветочных культур. Нами идентифицированы и описаны следующие вирусы: *Lily mottle potyvirus*, *Lily symptomless carlavirus*, *Cucumber mosaic cucumovirus*, *Tobacco rattle tobnavirus*, *Tomato ringspot nepovirus*. На гиацинте идентифицированы 4 вируса: *Hyacinth mosaic potyvirus*, *Arabis mosaic nepovirus*, *Tobacco rattle tobnavirus*, *Tobacco necrosis necrovirus*. На гиппеаструме – 4 вируса: *Hippeastrum mosaic potyvirus*, *Hippeastrum latent carlavirus*, *Cucumber mosaic cucumovirus*, *Tobacco mosaic tobnavirus*.

**Отбор внешне бессимптомных растений и их тестирование на отсутствие вирусов.** Отбор исходного материала осуществляли визуально. В экспериментах использовали сорта гиацинта Perles Ping, Innocence, Anna Marie, Purple King, Delft Blue,

сорта лилии Black Beauty, Crustpils, Christmas Mass, сорта гиппеаструма Marie Goretti, Carina, Peppermint.

Тестирование внешне здорового материала на отсутствие вирусов проводили на травянистых растениях-индикаторах *Chenopodium quinoa*, *Chenopodium murale* L., *Chenopodium. Amaranticolor*, *Nicotiana tabacum* 'White Burley', *N. glutinosa* L., *Gomphrena globosa*, *Licopersicon esculentum* Mill., *Datura stramonium*, *Cucumis sativus* 'Delicatess' и серологическим методом.

Всего проверено на вирусы около 600 сортообразцов. На многих из них идентифицированы вирусы огуречной мозаики, вирусы кольцевой и некротической пятнистостей. Эти луковицы были отбракованы. В результате проведенного тестирования обнаружено и привлечено к размножению *in vitro* 10 безвирусных растений четырех сортов лилии, 19 растений, представленных 19 сортами гиппеаструма. Для создания безвирусного посадочного материала используют заведомо здоровый исходный материал.

**Стерилизация и введение эксплантов в культуру.** Микроразмножение безвирусного материала осуществляют в течение всего года, используя органы здоровых растений: высечки листа, сегменты цветоноса и чешуй. Луковицы предварительно охлаждают в холодильной камере при 5°C в течение двух недель, что способствует оптимальной регенерации новых луковичек. Стерилизацию тканей и органов проводят вначале погружением в 70% этиловый спирт, затем 3% гипохлорит натрия с добавлением в раствор 3-5 капель детергента Tween-80. Продолжительность дезинфекции – от 3 до 15 минут в зависимости от типа экспланта, с последующей 5-кратной промывкой в стерильной дистиллированной воде. Подготовленные таким образом экспланты переносят на переносили на жидкую или агаризованную питательные среды.

Известно, что успех тканевого размножения в условиях *in vitro* зависит от типа экспланта, состава питательной среды и условий культивирования.

**Составы питательных сред.** Используя в качестве экспланта сегменты чешуй гиацинта, в питательную среду вводят ½ нормы микросолей по Кнопю, микроэлементы по Хеллеру (табл. 9).

Таблица 9

Составы питательных сред для регенерации *in vitro* луковиц гиацинта, мг/л

Table 9

Compounds of culture media for *in vitro* regeneration of *Hyacinthus* bulbs, mg l<sup>-1</sup>

Компоненты	Дифференциация меристематической ткани и регенерация луковиц	Массовая регенерация луковиц и ризогенез
<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>
<u>Макроэлементы</u>		
KNO <sub>3</sub>	125,0	125,0
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	500,0	500,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	125,0	125,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	125,0	125,0
<u>Fe-хеллат</u>		
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	25,0
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8
<u>Микроэлементы по Хеллеру:</u>		
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,0	1,0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,0	1,0
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,1	0,1
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,03	0,03
AlCl <sub>3</sub>	0,03	0,03

Продолжение таблицы 9

1	2	3
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,03	0,03
KJ	0,01	0,01
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,0	1,0
<u>Органические вещества</u>		
Никотиновая кислота	0,5	-
Тиамин·HCl	0,4	-
Аденин	1,0-5,0	-
Кинетин	0,1-0,5	-
БАП	0,1-0,2	0,1-1,0
НУК	0,25	0,1-0,5
ИМК	-	0,1-1,0
Глюкоза	20000,0	-
Сахароза	5000,0	30000,0
Агар	7500,0	7500,0
pH 5,6		

При культивировании меристематической ткани в питательную среду первого и последующего этапов добавляют БАП и НУК. Клональное микроразмножение лилии и гиппеаструма осуществляли на питательных средах Murashige., Skoog [56], Pierik R. [62] в некоторой модификации (табл. 10, 11).

Таблица 10

Составы питательных сред для разных этапов размножения лилии *in vitro*, мг/л

Table 10

Compounds of culture media for *Lily* micropropagation *in vitro*, mg l<sup>-1</sup>

Компоненты	Индукция каллусообразования и регенерация луковец	Регенерация луковец и растений	Ризогенез
<u>Макроэлементы</u>			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,0	1650,0	825,0
KNO <sub>3</sub>	1900,0	1900,0	950,0
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440,0	440,0	220,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370,0	370,0	185,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,0	170,0	85,0
<u>Fe-хеллат</u>			
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	37,3	37,3
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	27,8
<u>Микроэлементы</u>			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2	6,2
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22,3	22,3	22,3
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6	8,6
KJ	0,83	0,83	0,83
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25
<u>Органические вещества</u>			
Никотиновая кислота	0,5	0,5	-
Пиридоксин·HCl	0,5	0,5	-
Тиамин·HCl	0,4	0,4	-
Мезоинозит	100,0	100,0	-
Кинетин	2,0	1,0	-
НУК	1,5	0,5	3,0
pH 5,8			

**Условия содержания первичных эксплантов и клональное микроразмножение.**

Экспланты содержат в пробирках при постоянном освещении. Однако имеется некоторое различие в отношении к температурному фактору. Так, чешуи и меристематическая ткань лилии и гиппеаструма успешно индуцируют каллус и луковички, способствуя увеличению их количества и размера луковичек при температуре 25-28°C, в то время как у чешуй гиацинта большее количество луковичек формируется при 15°C. Размер детки-луковички увеличивается более интенсивно при 23-25°C.

Таблица 11

Составы питательных сред для регенерации растений гиппеаструма *in vitro*, мг/л

Table 11

Compounds of culture media for *Hippeastrum* regeneration *in vitro*, mg l<sup>-1</sup>

Компоненты	Дифференциация меристематической ткани и регенерация луковичек	Массовая регенерация луковичек и растений
<u>Макроэлементы</u>		
KNO <sub>3</sub>	80,0	80,0
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	300,0	300,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	720,0	720,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	16,5	16,5
KCl	65,0	65,0
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200,0	200,0
<u>Fe-хеллат</u>		
Na <sub>2</sub> EDTA	25,0	25,0
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8
<u>Микроэлементы</u>		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,5	1,5
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	7,0	7,0
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3,0	3,0
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	2,5	2,5
<u>Органические вещества</u>		
Никотиновая кислота	0,5	-
Пиридоксин·HCl	0,5	-
Тиамин·HCl	0,5	-
Мезоинозит	40,0	-
НУК	1,0-2,0	2,0-3,0
Глицин	2,0	-
БАП	0,2-1,0	0,5-1,5
Кинетин	0,2-0,4	-
Сахароза	30000,0	30000,0
pH 5,8		

Сегменты чешуй, помещенные на питательную среду, первоначально имеют белую окраску, затем окраска чешуй постепенно меняется, и через 2 недели они приобретают фиолетовую окраску. Через 4 недели на срезанных поверхностях чешуй начинается активная индукция каллусообразования и одновременное формирование детки. Количество луковичек бывает различным и зависит от состава питательной среды. Много луковичек появляется на эксплантах, помещенных на жидкую среду с добавлением цитокинина. При этом ткань чешуй, интенсивно разрастается, формируя новые луковички; особенно наглядно это можно проследить на сегментах чешуй лилии и гиппеаструма.

При каждом очередном пассаже на свежеприготовленную питательную среду такие разросшиеся ткани разрезают на части, что способствует быстрому нарастанию

луковиц. Часто у эксплантов размером 2 см в длину и 1 см в ширину, изолированных на питательную среду в перевернутом виде, то есть базальной стороной вверх, и погруженных в среду на половину сегмента, количество луковичек возрастает почти вдвое и достигает 15. Следует отметить, что регенерационная способность изолированных на питательную среду сегментов чешуй, цветоноса или меристемы гиацинта и гиппеаструма зависит от сезона года. Лучшее развитие наблюдают в период естественного вегетационного роста растений. Количество дифференцировавшихся луковичек на эксплантах чешуй также возрастает с добавлением в питательную среду БАП, но при этом задерживается индукция корнеобразования. На питательных средах с низким содержанием БАП в пределах 1,0 мг/л и увеличением концентрации НУК до 3,0 мг/л из сегментов чешуй и цветоносов гиппеаструма формируются регенеранты. Однако при увеличении концентрации БАП появляются плотно прижатые друг к другу луковички. Аналогичная закономерность выявлена при культивировании меристематической ткани лилии. От одной меристемы за 12 недель нами было получено 25 луковичек. Для регенерации корней луковички всех культур необходимо отделить друг от друга и перенести на новую питательную среду без цитокинина.

**Массовое размножение *in vitro* и адаптация *in vivo*.** Нашими исследованиями показана возможность неограниченного массового размножения *in vitro* безвирусного посадочного материала луковиц лилии, гиацинта и гиппеаструма при условии деления полученных луковиц на сегменты и пассажа на первый этап питательной среды.

У разных сортов в пределах одной культуры наблюдается различная регенерационная способность. Среди сортов гиацинта более активное образование детки наблюдается у сорта Purple King. Нами было получено от одной луковицы этого сорта около 300 новых луковичек. У лилии сорта Black Beauty размножено и выращено 700 регенерантов, и из одной луковицы гиппеаструма сорта Maria Goretti получено 100 регенерантов.

При пересадке на адаптацию *in vivo* из пробирок в вазоны используют торф и перлит в соотношении 2:1. Доращивают луковицы в теплице.

Таким образом, сочетание методов отбора безвирусных клонов и клонального микроразмножения, а также выборочного ретестирования является эффективной технологией массового получения здоровых клонов гиацинта, лилии и гиппеаструма.

### Выводы

На основе ранее выявленных и изученных вирусов цветочно-декоративных культур и представленных в данной статье биотехнологий оздоровления и размножения хризантемы садовой, гвоздики, цимбидиума, антуриума Андрэ, розы садовой, лилии, гиацинта и гиппеаструма разработана концептуальная модель системы освобождения растений от вирусов. Применяя ее, можно получать и размножать безвирусный посадочный материал и других видов и сортов цветочно-декоративных культур.

### Список литературы

1. Абраменко Н.М., Султанова О.Д. Исследования возможности применения культуры изолированных почек в сочетании с термо- и химиотерапией для получения свободных от вирусов и микоплазм клонов винограда // 1 совещание специалистов стран-членов СЭВ: Тез. Докл. – Кишинев: Штиинца, 1977. – С. 28-37.
2. Алехно Г.Д., Высоцкий В.А. Клональное микроразмножение роз // Цветоводство. – 1986. - № 1. – С. 16-17.
3. Бобырь А.Д. Химиопрофилактика и терапия вирусных растений. – К.: Наукова думка, 1976. – 255 с.

4. Бойко А.Л. Экология вирусов растений. – К.: Вища школа. – 1990. – 166 с.
5. Брежетова Л.Г., Крылов А.В., Астахова А.А. Освобождение растений *Nicotiana glutinosa* L. // Культура изолированных органов, тканей и клеток растений. М.: Наука, 1970. – С. 311-312.
6. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
7. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Учеб. Пособие. – М.: ФГК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
8. Журавлев Ю.Н. Фитовирусы в целом растении и в модельных системах. – М.: Наука, 1979. – 246 с.
9. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. – К.: Наукова думка, 1992. – 232 с.
10. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. – М.: Наука, 1983. – 232 с.
11. Кеглер Х., Кляйнхемпель Х., Эртель К., Презелер Г., Шимански Х.-Х., Шмидт Х., Шнаар Д., Вердеревская Т.Д. Борьба с вирусными болезнями растений / Пер. с нем. Г.И. Лойдиной; Под ред. И с предисл. И.Г. Атабекова и В.А. Шмыгли. – М.: Агропромиздат, 1986. – 480 с.
12. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи – К.: Логос, 2005. – 730 с.
13. Лайке Р., Лабес Л., Эртель К., Петерсдорф М. Использование культуры тканей и органов в селекции растений и производстве посадочного материала. Обзор. – Берлин: Акад. с.-х. наук ГДР. Ин-т с.-х. информации и документации, 1978. – 96 с.
14. Мельничук М.Д. Фітовірусолгія: Навчальний посібник. – К.: Поліграф Консалтинг, 2005. – 200 с.
15. Миною Н. Получение посадочного материала яблони и груши свободного от вирусных и микоплазменных заболеваний методом терапии // 1 совещание специалистов стран-членов СЭВ: Тез. Докл. – Кишинев: Штиинца, 1977. – С. 54-63.
16. Митрофанова О.В. Разработка биотехнологии ускоренного размножения в стерильной культуре цветочных растений на безвирусной основе // Всесоюз. Конф. ВАСХНИЛ: Тез. Докл. – Л., 1986. – С. 101-104.
17. Митрофанова О.В. Вирусные болезни промышленных цветочных культур и биотехнологические приемы оздоровления. – М., 1992. – Деп. В ВИНТИ, № 1729-В92 от 25.05.92. – 206 с.
18. Митрофанова О.В., Васильева Л.И. Вирусная мозаика гладиолусов в Крыму // Бюлл. Никит. Ботан. Сада. – 1974. – Вып. 3. – С. 45-48.
19. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В. Изучение вирусов цветочных культур и эффективные методы оздоровления растений *in vitro* // Вісн. Київ. Нац. ун-та м... Т.Г. Шевченка. Серія Біологія. – 2001. – Вип. 35. – С. 47-53.
20. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В. Биотехнологии освобождения от вирусов и клональное микроразмножение декоративных и плодовых растений // Труды Никит. ботан. сада. – 2012. – Т. 134. – С. 213-227.
21. Митрофанова О.В., Мустафин А.М. Технология выращивания безвирусного антуриума Андрэ. // Труды Никит. Ботан. Сада. – 1985. – Т. 97. – С. 115-124.
22. Митрофанова О.В., Славгородская-Курпиева Л.Е., Митрофанова И.В., Лукичева Л.А. Диагностика вирусных болезней и биотехнологические приемы получения безвирусного посадочного материала косточковых плодовых культур. – Ялта: Крымпресс, 2000. – 45 с.

23. Петерсон Л., Жола И., Донде Д. Размножение гвоздик с помощью культуры меристем для получения безвирусного исходного материала // Тр. Ин-та Латв. СХА. – 1974. – Вып. 82. – С. 53-57.
24. Попов Ю.Г. Культура *in vitro* меристематических верхушек стебля как метод оздоровления и размножения растений // Биологические науки. – 1976. – № 6. – С. 13-24.
25. Проценко А.Е. Электронномикроскопическое изучение фитопатогенных вирусов // Микробиология. – 1953. – Т. 22. – Вып. 6. – С. 709-713.
26. Тесленко А.В., Митрофанова О.В., Лукичева Л.А. Разработка технологии получения безвирусного материала персика // Сб. науч. Тр. Никит. ботан. сада. – 1986. – Т. 99. – С. 85-92.
27. Уоринг Ф., Филиппс И. Рост растений и дифференцировка: Пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – 512 с.
28. Цуркан И.Г. Термическая терапия плодовых, ягодных культур и винограда, пораженных вирусами. Кишинев: Картя Молдовеняскэ, 1973. – Вып. 11. – С. 68-124.
29. Харченко Л.Т. Получение растений картофеля, свободных от вирусной инфекции // Культура изолированных органов, тканей и клеток растений. – М.: Наука, 1970. С. 320-323.
30. Черевченко Т.М., Кушнир Г.П. Биология и размножение антуриума Андрэ в закрытом грунте // Докл. АН УССР, сер. Б. – 1981. С. 83-86.
31. Baker K.K., Ramsdell D.C., Gillett J.V. Electron microscopy: current applications to plant virology/ - Plant Diseases. – 1985. – Vol. 69. – P. 85-90.
32. Barnett O.W., Gibson P.B., Seo A. A comparison of heat treatment, cold treatment and meristem tip-culture for obtaining virus-free plants of *Trifolium repens* // Plant Dis. Rep. – 1975. – Vol. 59. – P. 834-837.
33. Biotechnology of Ornamental Plants / Eds. R.L. Geneve, J.E. Preece, S.A. Merkle. – Wallingford: CAB International, 1997. – 412 p.
34. Buys C., Poortmans P., Rudelle M. Serienmasige Meristemkulturen und Auswahl virusfreier Nelken im Grossen // Gartenwelt. – 1966. – Bd. 14. – S. 305-307.
35. Clark M.F., Adams A.N. Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses // Journal of General Virology. – 1977. – Vol. 34, N 3. – P. 475-483.
36. Davis D.R. Rapid propagation of roses *in vitro* // Scientia Horticulturae. – 1980. – N 13. – P. 385-389.
37. Elliott R. F. Axenic culture of meristem tips of *Rosa multiflora* // Planta. – 1970. – Vol. 95, N 2. – P. 183-186.
38. Farsi M., Taghavizadeh Yazdi M.E., Qasemionran V. Micropropagation of *Anthurium andreaeanum* cv. Terra // African J. Biotech. – 2012. – Vol. 11 (68). – P. 13162-13166.
39. Geier T., Reuther G. Vegetative vermehrung von *anthurium scherzianum* durch gewebekultur // Zierpflanzenbau. – 1981. – Bd. 21. – S. 476-477.
40. George E.F., Hall M.A., De Klerk G.-J. Plant Propagation by Tissue Culture. 3<sup>rd</sup> Edition. – Dordrecht, Netherlands: Springer, 2008. – 501 p.
41. Heller R. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro* // Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. – 1953. – N 14. – P. 1-223.
42. Hollings M., Kassanis B. The curl of chrysanthemums from some virus diseases by heat // J. Roy. Hort. Soc. – 1957. – Vol. 82, N 8. – P. 339-342.
43. Holmes F.O. Elimination of foliage spotting from sweet potato // Phytopathology. – 1956. – Vol. 46. – P. 502-504.

44. *Horvath J.* Host plants in diagnosis // Diagnosis of plant virus disease / Ed. R.E.F. Matthews. – Boca Raton: Florida: USA: CRC Press, 1993. – P. 15-48.
45. *Kassanis B.* Effects of changing temperature on plant virus diseases // Adv. Virus Res. – 1957. – Vol. 4. – P. 221-241.
46. *Kassanis B.* Plant tissue culture // Methods in Virology / Ed. K. Maramorosch, H. Koprowski. – New York, London: Acad. Press, 1967. – Vol. 1. – P. 537-566.
47. *Knop W.* Quantitative Untersuchungen über den Ernährungsprozess der Pflanzen // Land. Vers. Sta. – 1865. – Vol. 7. – P. 93.
48. *Knudson L.* A new nutrient solution for germination of orchid seeds // Amer. Orchid. Soc. Bull. – 1946. – Vol. 15, N 4. – P. 214-217.
49. *Koblitz H.* Zell- und Gewebezucht bei Pflanzen. – Jena: VEB Gustav Fischer Verlag, 1972. – 84 s.
50. *Kunkel L.O.* Peach mosaic not surged by heat treatment // Amer. J. Bot. – 1936. – Vol. 23. – P. 683.
51. *Milošević S., Cingel A., Jevremović S., Stanković I., Bulajić A., Krstić B., Subotić A.* Virus Elimination from Ornamental Plants Using *in vitro* Culture Techniques // Pestic. Phytomed. (Belgrade). – 2012. – Vol. 27, N 3. – P. 203-211.
52. *Mitrofanova O. V., Oertel C.* Erste Schritte auf dem Wege einer Zusammenarbeit der Virusfreimachung von Zierpflanzen Nikitzki Botanischen Garten Jalta. – Forschungslabor für Viruskrankheiten bei Zierpflanzen in VEB PAC – Jungpflanzen Dresden // Gartenbau. – 1981. – Bd. 28, H. 1. – S. 29-30.
53. *Moor J.D.* Heat treatment of sour cherry carrying yellows and necrotic ringspot // Phytopathology. – 1947. – Vol. 37. – P. 16.
54. *Morel G., Martin C.* Guérison de dahlia atteints d'une maladie à virus // C.R. Acad. Sci. – 1952. – V. 235. – P. 1324-1325.
55. *Morel G., Martin C.* Guérison de pommes de terre atteints d'une maladie à virus // C.R. Acad. Agr. France. – 1955. – Vol. 41. – P. 472-475.
56. *Murashige T., Skoog F.A.* Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15, N 13. – P. 473-497.
57. *Navalinskiene M., Samuitiene M.* Dekoratyvnių augalų virusinės ligos ir jų sukelėjai Lietuvoje. – Kaunas: Litute, 2006. – 256 p.
58. *Novák J.B., Lanzová J.* Identification of tomato bushy stunt virus in cherry and plum trees showing fruit pitting symptoms // Biologia Plantarum. – 1977. – Vol. 19, N 3. – P. 234-237.
59. *Novak F.J., Nepustil J.* Vegetativní množení *Anthurium andreaeanum* Lind. V culture *in vitro* // OVTIZ. Zahradnictvo. – 1980. – N 7. – S. 67-74.
60. *Oertel C.* Über die Viruskrankheiten der Edelnelke und Methoden der Gesunderhaltung // Arch. Gartenbau. – 1977. – Bd. 25, N 1. – S. 11-25.
61. *Pierik R.L.* Vegetative propagation of horticultural crop *in vitro* with special attention to shrubs and trees // Acta Horticulturae. – 1975. – N 54.
62. *Pierik R.L.* *Anthurium andreaeanum* plantlets produced from callus tissues cultivated *in vitro* // Physiol. Plantarum. – 1976. – N 37. – P. 80-82.
63. *Pierik R.L.M.* *In vitro* culture of Higher Plants/ 4<sup>th</sup> ed. – Netherland: Springer Verlag, 1999. – 360 p.
64. *Solberg R.A., Bald J.G.* Distribution of a natural and an alien form of tobacco mosaic virus in the shoot apex of *Nicotiana glauca* Grah. // Virology. – 1963. – Vol. 21. – P. 300-308.
65. *Thung T.H.* Smetstof en plantencel bij enkele virusziekten van de tabaksplant. IV // Tijdschr. Plantenziekten. – 1938. – Bd. 44. – S. 225-245.

66. Thomson A.D. Heat treatment and tissue culture as a means of freeing potatoes from virus Y // Nature. – 1956. – Vol. 177. – P. 709.

67. Torrence L., Jones R.A.C. Recent developments in serological methods suited for use in routine testing for plant viruses. – Plant Pathology. – 1981. – Vol. 30. – P. 1-24.

68. Toussaint A., Dekegel D., Vanheule G. Distribution of *Odontoglossum ringspot virus* in apical meristems of infected *Cymbidium* cultivars // Physiological Plant Pathology. – 1984. – Vol. 25. – P. 297-305.

69. Walkey D., Webb M. Virus in plant apical meristem // J. Gen. Virol. – 1968. – Vol. 3. – P. 311.

70. White P.R. Handbook of Plant Tissue Culture. Lancaster: Pa. Jagues Cattel Press, 1943. – 277 p.

**Mitrofanova O.V., Mitrofanova I.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Ivanova N.N. Using of biotechnological methods for plants improvement and propagation of virus-free planting material of perspective ornamental plants** // Works of the State Nikit. Botan. Gard. – 2014. – V. 138. – P. 5-56.

The article discusses the theoretical and practical questions of plants improvement from viruses and clonal micropropagation of virus-free planting material in Chrysanthemum, Carnation, Cymbidium, Anthurium Andre, Roses, Lilies, Hyacinths, Hippeastrum. A model system of plants improvement from viruses has been proposed.

**Key words:** ornamental plants, viruses, improvement, clonal micropropagation, virus-free material, in vitro.