А 03.00.14
О-361

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
ՄԻԿՐՈԲԻՈԼՈԳԻԱՅԻ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ ՌՈՒԲԵՆ ՀԵՆՐԻԿԻ

ՄԵԽԱԿԻ (*DIANTHUS CARYOPHILLUS* L.) ՎԻՐՈՒՍԱԶԵՐԾ ՏՆԿԱՆՅՈՒԹԻ ՍՏԱՑՄԱՆ ԵՎ ԿԱԼԱՆԽՈԷԻ (*KALANCHOE PINNATA* L. PERS.) ԱՐԱԳ ԲԱԶՄԱՑՄԱՆ ԵՂԱՆԱԿՆԵՐԻ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԵՎ ՄՇԱԿՈՒՄԸ

Գ.00.14 «Կենսատեխնոլոգիա» մասնագիտությամբ

կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի գիտական աստիճանի
հայցման ատենախոսության
ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԱԲՈՎՅԱՆ 2000

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ

ОГАНЕСЯН РУБЕН ГЕНРИКОВИЧ

ИЗУЧЕНИЕ И РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЗВИРУСНОГО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ГВОЗДИКИ (*DIANTHUS CARYOPHILLUS* L.) И БЫСТРОГО РАЗМНОЖЕНИЯ КАЛАНХОЭ (*KALANCHOE PINNATA* L. PERS.)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности
03.00.14 - "Биотехнология"

АБОВЯН – 2000

© National Library of Armenia OCR by Portmind

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Միկրոբիոլոգիայի ինստիտուտում:

Գիտական ղեկավարներ՝ ՀՀ ԳԳԱ թղթակից անդամ, կենսաբանական գիտությունների դոկտոր Ս.Պ.Սեմերջյան
կենսաբանական գիտությունների թեկնածու Մ.Գ.Հովհաննիսյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենսաբանական գիտությունների դոկտոր Ս.Խ.Մայրապետյան
կենսաբանական գիտությունների թեկնածու Ե.Ն.Շչերբակովա

Առաջատար կազմակերպություն՝ Երևանի պետական համալսարանի բույսերի ֆիզիոլոգիայի և մանրէաբանության ամբիոն

Պաշտպանությունը կայանալու է "8" սեպտեմբերի 2000թ. ժամը 15.00 ՀՀ ԳԱԱ Միկրոբիոլոգիայի ինստիտուտի 018 Մասնագիտական խորհրդում, ՀՀ ԳԱԱ նախագահության շենքում (Բնական գիտությունների բաժանմունք), հասցեն՝ 375019, ՀՀ, ք. Երևան, Մարշալ Բաղրամյան պող. 24:

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Միկրոբիոլոգիայի ինստիտուտի գրադարանում, հասցեն՝ 378510, ՀՀ, ք. Աբովյան, Արզնու խճուղի, հեռ/ֆաքս (37422)23240, է-փոստ microbio@pnas.sci.am

Սեղմագիրն առաքված է "7" օգոստոսի 2000թ.:

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար
կենսաբանական գիտությունների թեկնածու Ա.Վ.Գասպարյան

Тема диссертации утверждена в Институте микробиологии НАН РА.

Научные руководители: член-корреспондент Академии с.-х. наук РА, доктор биологических наук С.П.Семерджян
кандидат биологических наук М.Г.Оганесян

Официальные оппоненты: доктор биологических наук С.Х.Майрапетян
кандидат биологических наук Е.Н.Щербакова

Ведущая организация: кафедра физиологии растений и микробиологии Ереванского государственного университета

Защита состоится "8" сентября 2000г. в 15.00 часов на заседании Специализированного Совета 018 Института микробиологии НАН РА в здании Президиума НАН РА (Отделение естественных наук), по адресу: РА 375019, Ереван, пр. Маршала Баграмяна 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института микробиологии НАН РА по адресу: РА 378510, г.Абовян, Арзнинское шоссе, тел/факс (37422)23240, э-почта microbio@pnas.sci.am

Автореферат разослан "7" августа 2000г.

Ученый секретарь Специализированного Совета
кандидат биологических наук А.В.Гаспарян

2401-2000

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изучение, разработка и применение методов культур тканей и клеток растений *in vitro* является одной из актуальных проблем современной биотехнологии. Большой экономический эффект, достигаемый при применении указанных методов, в основном обусловлен очень высокими коэффициентами размножения и оздоровлением посадочного материала, а, следовательно, улучшением качества и увеличением выхода продукции [Долгих, 1997; Попов, 1999; Margara, 1982; Nadlanda, 1998]. Это относится и к размножению декоративных, лекарственных и редких видов растений.

Гвоздика садовая (*Dianthus caryophyllus* L.) - одна из наиболее широко распространенных в Армении цветочно-декоративных культур. Однако, гвоздика подвержена ряду вирусных заболеваний, которые являются причинами снижения продуктивности насаждений, ухудшения качества цветков, существенного снижения укореняемости черенков, ослабления роста маточных растений [Рыбалко, 1984; Poupet et al., 1981]. Поэтому разработка и апробация технологии получения безвирусного посадочного материала гвоздики (начиная с получения культуры меристематических верхушек *in vitro* и кончая получением укорененных безвирусных черенков) представляется актуальной задачей практического растениеводства Армении.

Каланхоэ перистое (*Kalanchoe pinnata* L. Pers.) - ценное лекарственное растение, сок которого широко применяется как противовоспалительное средство в различных областях медицины [Волошенко, 1998; Umbuzeiro-Valent et al., 1999]. Для промышленного производства сока каланхоэ требуется значительное количество зеленой массы этой культуры, что выводит на первый план проблему массового получения посадочного материала. Разработка методов быстрого размножения каланхоэ с применением методов культуры ткани *in vitro* позволила бы наладить получение необходимого количества посадочного материала этого ценного лекарственного растения.

Цели и задачи исследований. Основными целями исследований являлись проведение комплекса научно-исследовательских и производственных работ по созданию в Армении эффективной технологии получения безвирусного посадочного материала гвоздики, а также разработка способов быстрого размножения каланхоэ в культуре *in vitro*. В соответствии с поставленными целями было предусмотрено выполнение следующих задач:

- Изучение и подбор условий термической обработки донорных растений гвоздики с целью полного оздоровления от вируса крапчатости гвоздики (ВКГ).
- Разработка оптимального состава макро- и микросолей, гормональных и других добавок для оптимизации процесса регенерации растений гвоздики из меристематических верхушек и микроклонального размножения регенерантов в культуре *in vitro*.
- Изучение и выявление характера влияния физиологических особенностей микрорастений, маточников и черенков гвоздики на конечный выход посадочного материала.
- Получение и тестирование опытной партии оздоровленного посадочного материала гвоздики.
- Разработка оптимального состава гормональных добавок питательной среды и условий культивирования для индукции эмбриогенеза и органогенеза, регенерации микрорастений и микроклонального размножения каланхоэ в культуре *in vitro*.
- Получение опытной партии микрорастений каланхоэ, готовых к высадке в открытый грунт.

© National Library of Armenia

Научная новизна работы. Впервые в Армении разработана и осуществлена высокоэффективная технология получения безвирусного посадочного материала гвоздики садовой - одной из наиболее распространенных в республике цветочно-декоративных культур.

Разработана новая питательная среда с оптимальным составом гормональных добавок для регенерации меристематических верхушек гвоздики и микроклонального размножения регенерантов *in vitro*. Охарактеризовано влияние физиологических особенностей исходных растений гвоздики на конечный выход посадочного материала.

Установлено, что сочетание метода культуры меристем *in vitro* и термотерапии приводит к полному оздоровлению исследуемых сортов гвоздики, зараженных ВКГ.

Впервые разработаны эффективные способы быстрого размножения каланхоэ перистого - ценного лекарственного растения - посредством использования методов культуры ткани *in vitro*. Показана возможность регенерации микрорастений каланхоэ как путем соматического эмбриогенеза, так и прямого органогенеза в культуре *in vitro*. На основе сравнительного изучения подобран оптимальный состав питательной среды и гормональных добавок.

Практическая значимость работы. Полученные экспериментальные данные использованы для разработки технологии получения безвирусного посадочного материала гвоздики садовой. Использование оригинальной технологии позволило получить около 70000 оздоровленных от вирусов черенков семи сортов гвоздики меристемного происхождения, которые были переданы в цветоводческие хозяйства Армении.

При помощи разработанных способов размножения растений каланхоэ в культуре ткани *in vitro* было получено около 2000 микрорастений, готовых к высадке в условиях *in vivo*.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Применение метода меристематических верхушек в сочетании с предварительной термической обработкой донорных растений приводит к полному освобождению гвоздики от ВКГ.
- Термотерапия донорных растений гвоздики благоприятно влияет на дальнейшее развитие микрочеренков.
- Показатели роста и развития микрочеренков гвоздики *in vitro* зависят от того, из какой части побега регенеранта они были выделены.
- Состояние верхушечной меристемы черенков гвоздики можно определять по длине междоузлий побегов.
- Неукорененные черенки гвоздики можно хранить при низких температурах в течение двух месяцев без отрицательного воздействия.
- Растения каланхоэ размножаются in vitro как путем соматического эмбриогенеза, так и прямого органогенеза.

Апробация работы. Основные результаты и положения диссертации были представлены на 2-ой Международной конференции, посвященной современным проблемам беспочвенного культивирования растений (Ереван, 1997), заседаниях ученых советов Научного центра земледелия и защиты растений Министерства сельского хозяйства Республики Армения (26.04.2000г.) и Института микробиологии Национальной Академии наук Республики Армения (10.05.2000г.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 4 патента Республики Армения.

Место выполнения работы. Совместное научно-производственное объединение "Агробиотех" Национальной Академии наук и Министерства сельского хозяйства Республики Армения и Научный центр земледелия и защиты растений Министерства сельского хозяйства РА.

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 112 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследований, трех глав экспериментальной части, заключения, выводов, списка использованной литературы и приложений, включающих полученные по теме диссертации патенты. Работа содержит 13 таблиц и 5 рисунков. Список использованной литературы включает 173 русскоязычных и иностранных источников.

Обзор литературы обобщает современные представления о методах размножения цветочных и лекарственных растений с применением культуры ткани, способах получения безвирусного посадочного материала гвоздики и регенерации каланхоэ *in vitro*.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектами исследований являлись семь сортов гвоздики садовой *(Dianthus caryophyllus* L.) - Вильям Сим, Леди Кримсен, Уайт Сим, Лена, Ред Лена, Саломе и Парад, а также культура каланхоэ перистое (*Kalanchoe pinnata* L. Pers.),

Приготовление питательных сред. Для приготовления среды Мурасиге-Скуга (MS) [Murashige & Skoog, 1962] использовали готовый препарат фирмы SERVA (Германия), который доводили до нужной концентрации соответствующим количеством дистиллированной воды.

С целью оптимизации процесса микроклонального размножения ремонтантной гвоздики нами была разработана новая модифицированная питательная среда (названной нами RM-средой). Основные различия между модифицированной нами питательной средой RM и средой MS заключались в дополнительном присутствии нитратов кальция и натрия, резком понижении концентраций нитратов аммония и калия, а также микросолей (до 10 раз) и 2-кратном повышении концентрации хелатированной формы железа.

Диагностика ВКГ осуществлялась методом радиальной иммунопреципитации в агаровом геле. Для приготовления геля использовали 1,0%-ный агар-агар, 0,8%-ный NaCl и 0,02%-ный азид натрия (для предупреждения развития бактерий и грибков). Расплавленный агар разливали в стерильные чашки Петри по 10 мл. После охлаждения в слое агара специальным пробойником вырезали лунки, которые маркировали с наружной стороны чашки. В центральную лунку помещали сыворотку к ВКГ, а в перифирические - выжимку листьев тестируемого растения в трехкратной повторности. Чашки накрывали крышкой и помещали в термостат при температуре 24°С. Если растение содержало вирус, то антиген и антитело диффундировали навстречу друг другу, через сутки образуя хорошо видимые дуги преципитации.

Термотерапия. Маточные растения гвоздики помещали в климатическую камеру на 40-50 дней. В 16-часовой световой период освещенность (получаемая при помощи ламп ДРЛ-400) составляла 8,5-9 тыс. люкс на уровне растений, температура 38°С, в темновой период температуру поддерживали на уровне 26-28°С. По мере формирования черенков их снимали и переносили в стерильный бокс для вычленения меристематических верхушек.

Регенерация меристемных проростков гвоздики. Изолированные апикальные и латеральные меристематические верхушки размером 0,1-0,2 мм переносили в пробирки на поверхность агаризованной питательной среды и помещали в культу-

© National Library of Armenia

ральную комнату со следующим режимом: интенсивность освещения 3000-4000 люкс, температура 24°С, 16-часовой фотопериод, относительная влажность 70-80%. Для культивирования меристем в качестве экзогенных гормонов использовали 6-фурфуриламинопурин (кинетин - 1,0 мг/л), гиббереловую кислоту (ГК - 0,5 мг/л) и α-нафтилуксусную кислоту (НУК - 1,0 мг/л).

Микроклональное размножение регенерантов гвоздики. Меристемные микрорастения-регенеранты и их производные черенковали в стерильных условиях при помощи микрохирургических скальпелей. По достижении микрорастениями 5-6 см, их разрезали под междоузлиями на микрочеренки, которые переносили в пробирки на поверхность твердой питательной среды. Пробирки с микрочеренками размещали в штативы по 10, 20 или 40 штук и помещали в культуральную комнату. Режим выращивания соблюдали такой же, как и при культивировании меристематических верхушек.

Адаптация и укоренение микрорастений гвоздики. В качестве субстрата применяли перлит, который слоем в 10-12 см насыпали на стеллажи размерами 1,8 х 10 м. Перед посадкой перлит разравнивали, поливали и слегка уплотняли. Микрочеренки на 10-15 минут погружали в 0,4%-ный раствор цинеба и высаживали: летом - 400-500, зимой - 700-800 штук на 1 кв. м. Влажность воздуха должна быть не ниже 60-70%, что достигалось применением туманообразующей установки и накрыванием стеллажей с адаптируемыми микрорастениями полипропиленовой пленкой.

Получение и изучение черенков гвоздики. Адаптированные микрочеренки нулевого поколения (M_0) с нормально развитой корневой системой пересаживали в почвенный субстрат. Растения высаживали по 45-50 штук на 1 кв. м. По мере роста проводили прищипку над четвертым или пятым узлом. После формирования пазушных черенков первого поколения (M_1) их выламывали и после укоренения в перлите использовали в качестве маточников.

С целью формирования маточного куста через 1,5-2 месяца после посадки над четвертой парой листьев вторично прищипывали верхушку. Посадочный материал получали после 2-кратного проведения следующей процедуры: когда на вновь образованных пазушных побегах формировалось по 5-6 узлов, черенки вылымывали из узлов таким образом, чтобы на каждом стебле маточника оставалось по два узла. На реализацию шли черенки M_2, а также черенки M_3, полученные из пазушных почек в оставшихся узлах.

При необходимости неукорененные черенки хранили при +2°С и относительной влажности воздуха 90%.

Получение и изучение регенерантов каланхоэ. В качестве первичных эксплантов использовали листовые пластинки (высечки) растения *K. pinnata* размером 1,0 х 0,7 см, которые помещали в простерилизованные химические колбы (на 250 мл) и пробирки (диаметром 1,2-1,5 см и высотой 10-12 см) с твердой питательной средой Мурасиге-Скуга с добавками ауксинов (0,1 мг/л) и цитокининов (1,0 мг/л). Колбы и пробирки помещали в культуральную комнату со следующим режимом: интенсивность освещения 2.000-3.000 люкс, температура 20-24°С, фотопериод 16 часов.

Микрочеренкование регенерантов каланхоэ. Микрочеренкование проводили так же, как и при микроклональном размножении гвоздики, за исключением того, что микрорастения черенковали при достижении ими размера уже 3,5-4 см. В качестве питательной среды применяли среду Мурасиге-Скуга без гормональных добавок.

Статистическую обработку результатов проводили методами вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента - σ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Изучение условий регенерации микрочеренков гвоздики из верхушечных меристем в культуре in vitro

Для регенерации растений из меристем вначале использовали среду Мурасиге-Скуга с добавлением 7 г/л агар-агара, 15 г/л сахарозы и экзогенных фитогормонов.

Оптимальные экспланты состояли из меристематического конуса и одной пары листовых примордий. Меристемы размером менее 0,05 мм давали низкий процент регенерации растений; размером более 1,0 мм давали 100%-ную регенерацию, однако, резко возрастало количество растений, зараженных вирусами.

Применение лишь метода культуры меристематических верхушек без предварительной термообработки донорных растений доводило процент оздоровления от 12,5% (для сорта Саломе) до 31,8% (для сорта Леди Кримсен), однако, не приводило к полному освобождению от ВКГ (табл. 1).

Таблица 1

Выход оздоровленных от ВКГ регенерантов при использовании только метода культуры меристематических верхушек

СОРТ	Кол-во изолированных меристем (шт.)	Общее кол-во полученных меристемных регенерантов (шт.)	Кол-во полученных регенерантов, свободных от ВКГ (%)
Вильям Сим	46	30	26,7
Уайт Сим	46	28	25,0
Леди Кримсен	54	44	31,8
Лена	57	35	22,9
Ред Лена	57	34	17,6
Саломе	39	16	12,5
Парад	36	14	14,3

Поэтому начальной стадией технологии ускоренного получения безвирусного посадочного материала ремонтантной гвоздики являлась термотерапия маточных растений, проводимая с целью получения оздоровленных донорных растений для вычленения из них меристем. Поскольку из вирусов гвоздики основной ущерб насаждениям наносит ВКГ, в наших исследованиях под оздоровленными (безвирусными) растениями мы подразумевали растения гвоздики, свободные от ВКГ. Диагностику других, менее вредоносных, вирусов гвоздики (ВКЖГ, ВКГГ, ВНПГ, ВЖПГ, ВКПГ и др.) не проводили.

Уже 20-суточное воздействие высокой температурой (+38°С) на черенки способствовало освобождению от ВКГ растений гвоздики меристемного происхождения от 33,3% (для сортов Саломе и Парад) до 70% (для сорта Леди Кримсен) (табл. 2). По мере увеличения продолжительности термической обработки опытных растений существенно увеличивался процент выхода оздоровленных от ВКГ меристемных растений, доходя на сороковые сутки до 100% (кроме сортов Лена и Ред Лена, для которых полное оздоровление происходило на пятидесятые сутки).

Изолирование наряду с апикальными и латеральных меристематических верхушек из черенков, прошедших термотерапию, позволило получать дополнительное количество оздоровленных от ВКГ растений-регенерантов гвоздики.

© National Library of Armenia

Таблица 2

Влияние термотерапии на получение в культуре *in vitro* освобожденных от ВКГ меристемных регенерантов

СОРТ	Общий выход меристемных регенерантов (шт)	Выход свободных от ВКГ регенерантов (%)	Общий выход меристемных регенерантов (шт)	Выход свободных от ВКГ регенерантов (%)	Общий выход меристемных регенерантов (шт)	Выход свободных от ВКГ регенерантов (%)
	При 20 сутках термотерапии		При 40 сутках термотерапии		При 50 сутках термотерапии	
Вильям Сим	8	50,0	8	100	9	100
Уайт Сим	8	50,0	9	100	10	100
Леди Кримсен	10	70,0	9	100	12	100
Лена	10	60,0	11	90,9	13	100
Ред Лена	10	60,0	11	90,9	9	100
Саломе	6	33,3	7	100	8	100
Парад	6	33,3	5	100	5	100

В таблице 3 приведены данные по изучению влияния термотерапии на способность к регенерации изолированных меристем семи сортов ремонтантной гвоздики.

При исследовании влияния термотерапии на приживаемость изолированных меристематических верхушек гвоздики строго следили, чтобы для всех исследуемых сортов соблюдались абсолютно одинаковые условия термической обработки. Несмотря на генетические различия исследуемых сортов гвоздики, наивысший выход меристемных регенерантов для всех наблюдался при длительности термотерапии 40 суток (в среднем по сортам достигая с 68% до 86%). Положительному воздействию тепла особенно были подверждены сорта Леди Кримсен, Лена и Ред Лена (приживаемость меристем уже на 30-ые сутки термотерапии доходила до 90%; для сортов Лена и Ред Лена на 40-ые сутки наблюдали выход регенерантов в 91,7%). Для сорта Саломе этот показатель на 40-ые сутки термотерапии вырос более, чем в 2 раза. По-видимому, чем ниже у сорта выход регенерантов из меристем, выделенных у необработанных теплом растений, тем больше оно подвержено положительному воздействию термотерапии.

По истечении 40 суток термической обработки происходило некоторое снижение приживаемости изолированных меристем. Так, для сорта Ред Лена на 50-ые сутки термотерапии она снизилась более, чем на 30%. В среднем по сортам выход меристемных регенерантов упал с 86% при 40 сутках термообработки до 75% при 50 сутках. По всей видимости, имело место влияние экстремальных условий выращивания (высокая температура и освещенность) на метаболизм исследуемых растений.

Наблюдения за развитием прижившихся меристем показали стимулирующее влияние термической обработки на органогенез регенерантов *in vitro*. При одинаковых условиях культивирования полученные после термообработки микрорастения несколько опережали в развитии микрорастения, которые термотерапии не подвергались. Так, опережение в скорости роста в среднем составляло: для сорта Вильям Сим - 20,5%; Уайт Сим - 13,5%; Леди Кримсен - 22,4%; Лена - 15,8%; Ред Лена - 14,3%; Саломе - 12,5%; Парад - 12,9%.

Таблица 3

Влияние термотерапии на приживаемость изолированных меристематических верхушек гвоздики

СОРТ	Продолжительность термотерапии (сутки)	Изолировано меристем (шт)	Выход регенерантов (%)	Продолжительность термотерапии (сутки)	Изолировано меристем (шт)	Выход регенерантов (%)	Продолжительность термотерапии (сутки)	Изолировано меристем (шт)	Выход регенерантов (%)	Продолжительность термотерапии (сутки)	Изолировано меристем (шт)	Выход регенерантов (%)
Вильям Сим	0	6	66,7	0	10	60,0	0	8	87,5	0	10	50,0
	10	6	83,3	20	10	80,0	30	8	75,0	40	10	80,0
Уайт Сим	0	6	66,7	0	10	60,0	0	8	62,5	0	10	60,0
	10	6	83,3	20	10	80,0	30	8	87,5	40	10	90,0
Леди Кримсен	0	7	71,4	0	12	83,3	0	10	80,0	0	10	90,0
	10	7	71,4	20	12	83,3	30	10	90,0	40	10	90,0
Лена	0	8	50,0	0	12	66,7	0	10	60,0	0	12	50,0
	10	8	62,5	20	12	83,3	30	10	90,0	40	12	91,7
Ред Лена	0	8	50,0	0	12	66,7	0	10	50,0	0	12	58,3
	10	8	75,0	20	12	83,3	30	10	90,0	40	12	91,7
Саломе	0	5	40,0	0	10	40,0	0	6	50,0	0	8	37,5
	10	5	40,0	20	10	60,0	30	6	66,7	40	8	87,5
Парад	0	5	40,0	0	10	40,0	0	6	33,3	0	7	42,9
	10	5	60,0	20	10	60,0	30	6	66,7	40	7	71,4

СОРТ	Продолжительность термотерапии (сутки)	Изолировано меристем (шт)	Выход регенерантов (%)
Вильям Сим	0	12	66,7
	50	12	75,0
Уайт Сим	0	12	58,3
	50	12	83,3
Леди Кримсен	0	15	80,0
	50	15	80,0
Лена	0	15	66,7
	50	15	86,7
Ред Лена	0	15	66,7
	50	15	60,0
Саломе	0	10	40,0
	50	10	80,0
Парад	0	8	37,5
	50	8	62,5

Примечание: *культуры выращивали на питательной среде Мурасиге-Скога*

© National Library of Armenia

2. Сравнительная характеристика микроклонального размножения гвоздики в культуре in vitro

По достижении регенерантами роста в 4-6 см микрорастения с нормальным габитусом размножали микрочеренкованием. Первый пассаж проводили спустя 30 дней после вычленения меристем, в дальнейшем микрорастения черенковали каждые 20 дней. Средний коэффициент размножения за один пассаж составил (табл. 4): для сорта Вильям Сим - 1:3,1; Уайт Сим - 1:3,3; Леди Кримсен - 1:2,9; Лена - 1:3,7; Ред Лена - 1:3,4; Саломе - 1:2,8; Парад - 1:3,2.

Таблица 4

Влияние сортовых различий на коэффициенты микроклонального размножения гвоздики

СОРТ	Кол-во имеющихся регенерантов	1-ый пассаж		2-ой пассаж		3-ий пассаж		Коэф-нт размножения за три пассажа
		Кол-во получен. микро черенков	Коэф-нт размножения	Кол-во получен. микро-черенков	Коэф-нт размножения	Кол-во получен. микро-черенков	Коэф-нт размножения	
Вильям Сим	9	30	3,3	96	3,2	269	2,8	29,6
Уайт Сим	7	22	3,7	75	3,4	218	2,9	36,5
Леди Кримс.	10	31	3,1	90	2,9	243	2,7	24,3
Лена	14	54	3,9	206	3,8	679	3,3	48,9
Ред Лена	7	25	3,6	91	3,6	274	3,0	38,9
Саломе	5	15	3,0	38	2,5	102	2,7	20,2
Парад	4	14	3,5	44	3,1	128	2,9	31,5

Относительно невысокие коэффициенты размножения (в среднем 3,2%) по сравнению с количеством образованных междоузлий (4-5) объясняется выпадением за счет выбраковки уродливых регенерантов, регенерантов с признаками витрификации и регенерантов с зараженной средой. Для дальнейшего размножения отбирались лишь те регенеранты, которые строго соответствовали признакам нормального растения.

С целью оптимизации процесса микроклонального размножения ремонтантной гвоздики среда MS была подвергнута ряду модификаций. Об эффективности разработанной нами среды RM свидетельствуют данные, приведенные в таблице 5.

Таблица 5

Сравнительный анализ результатов микроклонального размножения гвоздики на питательных средах MS и RM

СОРТ	Начало укоренения (дни)		Высота роста за 20 дней культивирования (см)		Кол-во видимых узлов (шт)	
	MS	RM	MS	RM	MS	RM
Вильям Сим	8	5	1,9	3,6	2,4	4,0
Уайт Сим	10	6	1,8	3,4	2,3	4,1
Леди Кримсен	8	5	2,3	3,5	2,5	4,5
Лена	9	5	2,0	3,5	2,2	3,9
Ред Лена	8	6	1,9	3,4	2,1	3,9
Саломе	10	6	1,5	3,1	1,6	3,6
Парад	12	7	1,4	2,9	1,5	2,8

Как видно из приведенных данных, при микроклональном размножении гвоздики на безгормональной RM-среде, по сравнению с MS-средой, по всем изученным сортам в среднем срок укоренения сократился в 1,6 раз, за один и тот же период времени микрорастения вырастали в 1,7 раз выше и на них формировалось в 1,7 раз

больше узлов. Все это в совокупности приводило к повышению эффективности микроклонального размножения микрочеренков гвоздики более, чем на 50% (в основном за счет значительного сокращения самого процесса).

В дальнейшем, RM-среда использовалась и при регенерации *in vitro* меристематических верхушек гвоздики, при этом в качестве гормонов к ней добавлялись все те же 1,0 мг/л кинетина, 0,5 мг/л ГК и 1,0 мг/л НУК. И в этом случае RM-среда была более эффективна по сравнению с MS-средой (табл. 6). Так, для сорта Парад выход меристемных регене-рантов на среде RM превышало число регенерированных на MS-среде микрорастений почти 1,8 раза, а выход регенерировавших микрорастений у сорта сорта Леди Кримсен доходил до 95%. Кроме того, скорость роста меристемных регенерантов на RM-среде, например, для сорта Леди Кримсен превышал тот же показатель для MS-среды почти в 2 раза.

Таблица 6

Сравнительные данные по использованию сред MS и RM при получении регенерантов гвоздики *in vitro*

СОРТ	Выход меристемных регенерантов (%)		Высота меристемных регенерантов через 30 дней культивирования (см)	
	на среде MS	на среде RM	на среде MS	на среде RM
Вильям Сим	66,2	92,1	2,3	3,4
Уайт Сим	61,5	91,4	2,1	3,5
Леди Кримс.	80,9	95,0	2,2	4,1
Лена	58,7	88,4	2,0	3,6
Ред Лена	58,3	87,3	2,0	3,3
Саломе	41,5	66,4	1,9	3,1
Парад	38,7	71,2	1,8	3,0

Примечание: *меристематические верхушки вычленяли после 40-дневной термической обработки донорных растений*

У всех сортов гвоздики рост и развитие микрочеренков *in vitro* зависели от того, из какой части побега регенеранта они были выделены. Наиболее активно росли микрочеренки, выделенные из султана побега (группы листьев со сближенными узлами на верхушке побега). Их длина примерно в 1,5 раза превышала длину микрочеренков из низлежащих узлов побега регенерантов. Длина междоузлий и их число у побегов микрочеренков из султана также была большей.

Изредка нижние листья побега регенеранта давали начало не одному, а двум побегам микрочеренков, средняя длина, количество узлов и длина междоузлий которых были меньше по сравнению с одиночными побегами.

Способность легко и быстро укореняться позволяет растениям из микрочеренков успешно проходить адаптацию в субстрате. По этому признаку различия между микрочеренками были обнаружены только в вариантах, где их выделяли из регенерантов, состоящих из пяти или семи узлов. Однако, различия были значимыми только у микрочеренков султана и микрочеренков из одного-двух нижних узлов регенеранта. Корни образовывались на 2-3 суток раньше у микрочеренков из средних узлов. Иногда формирование корней при культивировании *in vitro* на питательной среде RM отмечали уже на 14-е сутки культивирования.

3. Изучение характеристик черенков гвоздики меристемного происхождения, выращиваемых в условиях закрытого грунта

По достижению желаемого количества регенерантов отдельными партиями отбирали здоровые микрорастения с хорошо развитым габитусом, достигшие высоты 5-7 см и имеющие 4-5 пар листьев, и переносили на стеллажи разводочной теплицы.

© National Library of Armenia

Через 30 дней после посадки адаптированные микрорастения с хорошо развитой корневой системой пересаживали в субстрат для получения черенков I-го поколения. На этой стадии выпадения растительного материала практически не наблюдали.

В ходе получения черенков I-го поколения (M_1) микрорастения пересаживали по 40-50 штук на 1 кв. м. Загущенные посадки (более 50 штук на 1 кв. м) давали больше черенков, но сравнительный вес каждого черенка был в среднем на 1 г ниже.

Через 1-1,5 месяца после посадки над шестой парой листьев делали прищипку и еще примерно через два месяца получали по 4-5 стандартных черенков I-го порядка.

Растения, образовавшиеся из микрочеренков султана, давали начало побегам, имеющим по сравнению с другими более развитый габитус. В то же время, растения, формирующиеся из нижних узлов регенеранта, давали начало более ослабленным побегам с длинными междоузлиями. Микрочеренки же из средней части побега давали выравненный по большинству признаков посадочный материал.

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что при размножении микрочеренкованием растений-регенерантов гвоздики целесообразно отказаться от использования микрочеренков из султана и нижнего узла регенеранта, образующих нестандартные маточные растения. Не следует также использовать для микрочеренкования регенеранты с количеством узлов, превышающих 5-6, т. к. это также приводит к получению разнокачественного посадочного материала.

Черенки I-го поколения высаживали в разводочную теплицу на укоренение. Для стимуляции корнеобразования в субстрат (перлит) добавляли раствор гетероауксина, тогда черенки образовывали корни за 14-16 дней. Без стимуляции ризогенеза корни образовывались не раньше 25 дней.

Укорененные черенки I-го поколения использовали для формирования маточных растений.

Примерно через месяц после посадки укорененного черенка с 3-4 узлами прищипкой над 4-ым узлом формировали 3-4 побега II-го порядка. Чтобы сформировать высокопродуктивные растения из черенка с одним-двумя узлами, прищипку задерживали до образования на побеге I-го порядка 5-6 узлов (в этом случае прищипку проводили через два месяца после посадки). Если прищипывали раньше, то побегов II-го порядка образовывалось меньше.

Данные по результатам черенкования гвоздики приведены в таблице 7. За восемь месяцев, начиная со дня закладки маточников, было получено около 68800 черенков II-го и III-го поколений. Одно микрорастение в среднем образовывало 33 черенка. Из исследуемых сортов лучше размножались растения гвоздики сорта Лена, хуже - Саломе.

Полученные черенки M_2 и M_3 перед передачей в цветоводческие хозяйства проходили такую же процедуру укоренения в перлите, как и при укоренении черенков M_1.

Черенки с одним-двумя узлами и массой менее семи грамм, а также черенки, у которых в верхушечной меристеме прекратилось образование листьев и наметился переход в генеративную фазу, образовывали слабую корневую систему. У последних корни иногда вообще не появлялись.

Черенки, готовые к образованию верхушечного цветка, нецелесообразно брать для укоренения; с таких побегов получали плохой посадочный материал. Переход к развитию верхушечного цветка сопровождается удлинением междоузлий, расположенных ближе к цветку. Было обнаружено, что длину междоузлий можно использовать в качестве визуального признака состояния апекса черенков, взятых для укоренения. Если длина нижнего междоузлия черенка с двумя-тремя видимыми узлами не превышает двух сантиметров, то этот черенок можно считать вегетативным. Длина нижнего междоузлия черенка, превышающая два сантиметра, указывает на переход побега, с которого взят черенок, к формированию верхушечного цветка.

Таблица 7

Влияние сортовых различий гвоздики на выход черенков

СОРТ	Исходное кол-во микро-растений (шт)	Черенки I-го поколения		Черенки II-го поколения		Черенки III-го поколения		Общее кол-во полученных черенков I и II-го поколений (округл. шт)
		Кол-во (шт)	Коэф-нт размно-жения	Кол-во (шт)	Коэф-нт размно-жения	Кол-во (шт)	Коэф-нт размно-жения	
Вильям Сим	269	914	3,4	3120	3,4	6000	1,9	9100
Уайт Сим	218	695	3,2	2430	3,5	4600	1,9	7000
Леди Кримсен	243	874	3,6	3140	3,6	6200	2,6	9300
Лена	679	2580	3,8	9550	3,7	19000	2,0	28500
Ред Лена	274	982	3,6	3280	3,3	6500	2,0	8700
Саломе	102	303	3,0	900	3,0	1600	1,8	2500
Парад	128	408	3,2	1270	3,1	2100	1,7	3700

В случае необходимости неукорененные черенки хранили в холодильной камере. При подборе оптимальных условий черенки практически не теряли способности к укоренению в течение двух месяцев. Больше двух месяцев черенки в холодильной камере не хранили, во избежание риска снижения выхода укоренившихся черенков.

Исследования показали, что если для сортов гвоздики Саломе и Парад двухмесячное хранение неукорененных черенков при 2°С привело к некоторому снижению выхода укорененных черенков (на 2-3%), то для остальных исследуемых сортов отрицательного воздействия обнаружено не было.

При выборочном тестировании микрорастений, полученных в ходе микроклонального размножения *in vitro* регенерантов, образовавшихся из меристем растений, прошедших курс термотерапии, ВКГ обнаружено не было. Это еще раз свидетельствует о высокой эффективности сочетания термотерапии и метода культуры меристем для получения безвирусных растений.

Однако, в условиях *in vivo* нам не всегда удавалось предохранить оздоровленные растения от повторного заражения ВКГ. При тестировании растений маточных посадок непосредственно перед снятием черенков зараженность вирусом крапчатости гвоздики (на 100 выборочных растений каждого сорта) составила 4-8%.

4. Изучение условий экспресс-размножения каланхоэ с применением методов культуры ткани

При подборе оптимального гормонального состава питательной среды для получения эмбриогенного каллуса первичные экспланты помещали твердую питательную среду Мурсиге-Скуга, содержащей ауксины и цитокинины в различных сочетаниях.

Наилучшее каллусообразование наблюдали в присутствии 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и 6-бензиламинопурина (БАП). Уже через 1,5 месяца образовывался разросшийся темно-зеленый блестящий каллус. При помещении первичного эксплантa на среду с удвоенной концентрацией 2,4-Д пролиферация каллуса была еще более активной. Полученный при таких условиях

© National Library of Armenia

морфогенный каллус был по своей природе гетерогенным и состоял из клеток многих типов, включая и инициали предзародышей.

При пассировании полученного каллуса на среду Мурасиге-Скуга с добавкой 0,1 мг/л НУК еще через 1,5 месяца наблюдали массовую регенерацию из эмбриоидных клеток микрорастений каланхоэ. Регенеранты достигали 3-4 см роста и имели нормально сформированный габитус и хорошо развитую корневую систему.

Таким образом, при использовании в качестве эксплантов высечек листа в течение 2,5 месяцев культивирования *in vitro* получали в среднем 4-6 микрорастений-регенерантов из одного эксплантa.

Поскольку имеются данные, что использование в качестве эксплантов органов микрорастений моркови, предварительно полученных в культуре *in vitro*, приводило к ускорению процессов соматического эмбриогенеза [Yasuda et al., 1998], мы применили этот метод и к каланхоэ.

В качестве эксплантов использовались кусочки листьев и стеблей микрорастений, регенерированных *in vitro* из первичного каллуса. В качестве растительных гормонов в среду Мурасиге-Скуга добавляли 0,2 мг/л 2,4-Д и 2,0 мг/л БАП. Уже на исходе 4-ой недели содержания в культуральной комнате наблюдалось образование активно пролиферирующего каллуса. При переносе полученного из "пробирочных" эксплантов эмбриогенного каллуса в MS-среду с 0,1 мг/л НУК через еще примерно 4 недели из каждого эксплантa наблюдали образование 5-8 регенерантов.

Таким образом, регенерация микрорастений *K. pinnata* посредством непрямого соматического эмбриогенеза в культуре каллусной ткани *in vitro* происходила примерно в 1,5 раза быстрее, чем если в качестве первичного эксплантa использовали части органов (листьев и стеблей) микрорастений, предварительно полученных в условиях *in vitro*.

В вариантах с присутствием в среде β-индолил-3-уксусной кислоты (ИУК - 0,1 мг/л) и БАП (1,0 мг/л), индолилмасляной кислоты (ИМК - 0,1 мг/л) и БАП (1,0 мг/л), НУК (0,1 мг/л) или БАП (1,0 мг/л) примерно через 1 месяц культивирования экспланты, минуя стадию каллусообразования, давали начало клубневидным протокормам, на которых еще спустя 15-20 дней культивирования *in vitro* регенерировали проростки, в основном содержащие одну пару листьев (15-20 штук из одного эксплантa). Полученные регенеранты в 30% случаев имели слаборазвитую корневую систему и не формировали нормального габитуса. Видимо, имело место явление, известное как прямой органогенез путем образования придаточных побегов [Тиссера, 1989].

После получения регенерантов как посредством непрямого соматического эмбриогенеза, так и прямого органогенеза следующим этапом являлся процесс микроклонального размножения микрорастений *in vitro*. В качестве питательной среды применялась как наиболее широко распространенная среда Мурасиге-Скуга (MS-среда), так и разработанная нами для мериклонального размножения гвоздики среда RM. В отличие от гвоздики, микрочеренки каланхоэ по всем показателям лучше развивались на безгормональной среде MS.

Несмотря на то, что регенеранты, полученные посредством прямого органогенеза, по сравнению с регенерантами, полученными в ходе соматического эмбриогенеза, были развиты гораздо хуже, тем не менее, уже после первого же пассажа микроклонального размножения количество полученных нормальных микрорастений из таких регенерантов не уступало таковому для "эмбриоидных" регенерантов. Примерно 30%-ный выпад микрочеренков (в результате слабого развития) компенсировался их большим количеством. Причем, выравнивание происходило и по габитусу.

Микроклональное размножение *in vitro* вели так же, как и в случае гвоздики. Микрорастения выращивали в культуральной комнате примерно 1 месяц до достижения ими роста 3-5 см (при этом они имели 4-5 узлов и хорошо развитую корневую систему), затем черенковали. Во избежание размножения растений с генетическими нарушениями, все микрорастения даже с небольшими отклонения от стандарта выбраковывались. Средний коэффициент размножения составил 1:3,2 за один пассаж. Его можно было увеличить за счет получения большего количества междоузлий, однако, мы избегали этого ввиду ухудшения габитуса микрорастений с более, чем 5 междоузлиями.

После проведения трех пассажей микроклонального размножения каких-либо видимых отклонений у получаемых микрорастений каланхоэ отмечено не было. Из одного эксплантa в среднем получили 160 регенерантов (всего было получено около 2000 микрорастений). Все они имели хорошо развитую корневую систему, нормально сформированный габитус и были готовы к высадке в условия открытого грунта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Гвоздика садовая (*Dianthus caryphyllus* L.) - одна из наиболее широко распространенных в Армении цветочно-декоративных культур. Однако, гвоздика подвержена ряду вирусных заболеваний, которые являются причинами снижения продуктивности насаждений, ухудшения качества цветков, существенного снижения укореняемости черенков, ослабления роста маточных растений [Рыбалко, 1984а]. Поэтому было предпринято исследование по подбору оптимальных условий получения безвирусного посадочного материала гвоздики.

В соответствии с литературными данными [Жола и Каулиньш, 1984; Козицкий и др., 1976], на первой стадии исследований для регенерации растений из меристем использовали среду Мурасиге-Скуга [Murashige & Skoog, 1962] с добавлением экзогенных фитогормонов в следующих концентрациях: кинетин (1,0 мг/л), ГК (0,5 мг/л) и НУК (1,0 мг/л).

Применение лишь метода культуры меристематических верхушек без предварительной термообработки донорных растений исследуемых сортов гвоздики доводил процент оздоровления от 12,5% до 31,8%. Полного освобождения от ВКГ не происходило, что подтверждает литературные даннные [Рыбалко и Харута, 1978].

С целью получения оздоровленных донорных растений для вычленения из них свободных от ВКГ меристем проводили термотерапию маточных растений. По мере увеличения продолжительности термической обработки опытных растений процент выхода оздоровленных от ВКГ меристемных растений увеличивался, достигая на сороковые сутки до 100%, что согласуется с литературными данными [Александрова, 1970; Петерсон и др., 1974].

Показано, что термотерапия положительно влияла и на способность к регенерации изолированных меристем исследуемых сортов ремонтантной гвоздики. Наивысший выход меристемных регенерантов наблюдался при длительности термотерапии 40 суток (в среднем по сортам достигая 68-86%).

По достижении регенерантами роста в 4-6 см микрорастения с нормальным габитусом размножали микрочеренкованием. Средний коэффициент размножения за один пассаж составил 1:3,2.

С целью оптимизации процесса микроклонального размножения ремонтантной гвоздики среда MS была подвергнута ряду модификаций. При микроклональном размножении гвоздики на модифицированной нами питательной среде (названной средой RM), по сравнению с MS-средой, по всем изученным сортам в среднем срок

© National Library of Armenia

укоренения сократился в 1,6 раз, за один и тот же период времени микрорастения вырастали в 1,7 раз выше и на них формировалось в 1,7 раз больше узлов. Все это в совокупности приводило к сокращению процесса микроклонального размножения черенков гвоздики более, чем на 50%.

RM-среда с добавками экзогенных фитогормонов использовалась и при регенерации *in vitro* меристематических верхушек гвоздики. Показано, что выход меристемных регенерантов на среде RM превышал число регенерированных на MS-среде микрорастений до 80%, а скорость роста меристемных регенерантов увеличивалась до 100%.

Здоровые микрорастения с хорошо развитым габитусом переносили на стеллажи разводочной теплицы. После получения черенков I-го поколения их высаживали в разводочную теплицу на укоренение. Укорененные черенки I-го поколения использовали для формирования маточных растений.

Полученные на маточниках черенки II-го (M_2) и III-го поколений (M_3) использовали в качестве оздоровленного посадочного материала. Показано, что длина нижнего междоузлия черенка, превышающая два сантиметра, указывает на переход побега, с которого взят черенок, к формированию верхушечного цветка. Такие черенки необходимо считать некондиционными.

Исследования показали, что двухмесячное хранение неукорененных черенков при 2°С практически не привело к отрицательному воздействию, что совпадает с литературными данными [Романовска, 1987].

Хотя в некоторых случаях нам не удавалось предохранить оздоровленные растения от их повторного заражения ВКГ, тем не менее, уровень зараженности оказался гораздо ниже, чем приведенный в литературе [Клешнина и др., 1989; Рыбалко, 1984б]. Так, при тестировании растений маточных посадок непосредственно перед снятием черенков на реализацию зараженность вирусом крапчатости гвоздики в зависимости от сорта составила от 4% до 8%.

Как было отмечено, одним из преимуществ применения в практическом растениеводстве методов культуры ткани *in vitro* заключается в резком ускорении процесса размножения важных хозяйственных, в том числе лекарственных, растений.

Каланхоэ перистое (*Kalanchoe pinnata* L. Pers.) - ценное лекарственное растение, сок которого широко применяется как лечебное средство в медицинской практике [Волошенко, 1998; Umbuzeiro-Valent et al., 1999]. Для промышленного производства сока каланхоэ требуется значительное количество зеленой массы этой культуры. Поэтому было предпринято исследование по подбору условий микроклонального размножения каланхоэ в культуре *in vitro*.

Для получения эмбриогенного каллуса экспланты, в качестве которых использовались высечки из листьев нижнего яруса растения *K. pinnata*, помещали на твердую питательную среду Мурасиге-Скуга, содержащую различные сочетания ауксинов и цитокининов.

Уже через 1,5 месяца на среде MS с добавкой 2,4-Д и БАП образовывался темно-зеленый блестящий каллус, состоящий из клеток многих типов, включая и инициали предзародышей. При пассировании полученного каллуса на среду MS с добавкой НУК еще через 1,5 месяца наблюдали массовую регенерацию из эмбриоидных клеток микрорастений каланхоэ.

Поскольку имеются данные, что использование в качестве эксплантов органов микрорастений моркови, предварительно полученных в культуре *in vitro*, приводило к ускорению процессов соматического эмбриогенеза [Yasuda et al., 1998], этот метод был применен и к каланхоэ.

В качестве эксплантов использовались кусочки листьев и стеблей микрорастений, регенерированных *in vitro* из первичного каллуса. В качестве растительных гормонов в среду MS добавляли 2,4-Д и БАП. Уже на исходе 4-ой недели наблюдали образование активно пролиферирующего каллуса. При переносе полученного эмбриогенного каллуса в MS-среду с НУК через еще примерно 4 недели из каждого эксплантa наблюдали массовое образование регенерантов.

Таким образом, регенерация микрорастений *K. pinnata* посредством непрямого соматического эмбриогенеза в культуре каллусной ткани *in vitro* происходила примерно в 1,5 раза быстрее если в качестве первичных эксплантов использовали части органов (листьев и стеблей) микрорастений, предварительно полученных в условиях *in vitro*.

На среде MS, содержащей в качестве гормональных добавок ИУК и БАП или ИМК и БАП или НУК или БАП, примерно через 1 месяц культивирования экспланты, минуя стадию каллусообразования, давали начало клубневидным протокормам, на которых еще спустя 15-20 дней культивирования регенерировали проростки. Видимо, имело место явление, известное как прямой органогенез путем образования придаточных побегов [Тиссера, 1989].

Таким образом, удалось получить регенерацию растений каланхоэ *in vitro* не только методом соматического эмбриогенеза, но и прямого органогенеза. Это согласуется с литературными данными, полученными для некоторых видов растительных культур [Жаркова и др., 1998; Bronner et al., 1994; Silvertand et al., 1996].

В качестве питательной среды для микроклонального размножения каланхоэ применялась безгормональная среда.Мурасиге-Скуга. Коэффициент размножения составил в среднем 1:3,2 за один пассаж. Все регенеранты имели хорошо развитую корневую систему и были готовы к высадке в условия открытого грунта.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

- Разработанная технология получения безвирусного посадочного материала гвоздики рекомендуется к внедрению на одном из семеноводческих хозяйств Армении с целью обеспечения цветоводческих хозяйств республики качественными черенками гвоздики.
- Для регенерации меристем и микроклонального размножения гвоздики рекомендуется использовать разработанную нами питательную среду RM, обеспечивающую ускорение процесса размножения культуры *in vitro* в 1,5 раза.
- Разработанные способы регенерации каланхоэ из первичных эксплантов путем соматического эмбриогенеза и прямого органогенеза и микроклонального размножения регенерантов на среде Мурасиге-Скуга с добавками экзогенных фитогормонов рекомендуются применять в практике ускоренного получения большого количества посадочного материала каланхоэ.

ВЫВОДЫ

1. На основе проведенного комплекса исследований установлена эффективность применения метода культуры меристематических верхушек в сочетании с предварительной термотерапией донорных растений для полного освобождения от ВКГ зараженных растений исследуемых сортов гвоздики.
2. Сравнительная оценка влияния низких температур на состояние неукорененных черенков гвоздики показала возможность получения посадочного материала

© National Library of Armenia

гвоздики к определенному сроку с помощью применения метода длительного хранения черенков при 2°С.

3. Разработана и запатентована новая питательная среда для регенерации микрорастений гвоздики из меристематических верхушек и микроклонального размножения регенерантов.
4. Разработана и в условиях Армении успешно апробирована эффективная технология получения безвирусного посадочного материала ремонтантной гвоздики (*Dianthus caryophyllus* L.) посредством использования культуры ткани *in vitro*.
5. Разработаны и запатентованы способы ускоренного размножения в культуре *in vitro* лекарственного растения каланхоэ перистого (*Kalalanchoe pinnata* L. Pers.) посредством соматического эмбриогенеза и прямого органогенеза.
6. Применение в качестве эксплантов для размножения каланхоэ частей органов микрорастений, предварительно введенных в культуру *in vitro*, позволяет в 1,5 раза ускорить процесс регенерации путем соматического эмбриогенеза.
7. Показано, что при размножении растений каланхоэ в культуре *in vitro* наиболее оптимальной является среда Мурасиге-Скуга с добавками экзогенных фитогормонов (для получения регенерантов) и без гормональных добавок (для микроклонального размножения регенерантов).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. *Оганесян Р.Г., Оганесян М.Г., Арутюнян А.Г.* Опыт мериклонального размножения гвоздики // Биолог. журн. Армении. - 1985. - 6 с. - Деп. в ВИНИТИ 20.09.95, N148Ар.
2. *Арутюнян А.Г., Оганесян Р.Г., Оганесян М.Г.* Регенерация *Kalanchoe pinnata* путем соматического эмбриогенеза в культуре *in vitro* // Биолог. журн. Армении. - 1985. - 4 с. - Деп. в ВИНИТИ 20.09.95, No.149Ар.
3. ՀՀ վկայական 242, ՄԱԴ[5] C 12 N 5/00. *Kalanchoe pinnata* տեսակի բույսերի բազմացման եղանակ / *Հարությունյան Ա.Գ., Հովհաննիսյան Ռ.Հ., Հովհաննիսյան Մ.Գ.* (ՀՀ). - N000177; Ներկայացվել է 21.12.93; Հրապարակվել է 15.09.96, N1 - 1 էջ:
4. ՀՀ վկայական 243, ՄԱԴ[5] C 12 N 5/00. *Kalanchoe pinnata* տեսակի բույսերի բազմացման եղանակ / *Հարությունյան Ա.Գ., Հովհաննիսյան Ռ.Հ., Հովհաննիսյան Մ.Գ.* (ՀՀ). - N000178; Ներկայացվել է 21.12.93; Հրապարակվել է 15.09.96, N1 - 1 էջ:
5. ՀՀ վկայական 244, ՄԱԴ[5] C 12 N 5/00. *Kalanchoe pinnata* տեսակի բույսերի բազմացման եղանակ / *Հարությունյան Ա.Գ., Հովհաննիսյան Ռ.Հ., Հովհաննիսյան Մ.Գ.* (ՀՀ). - N000179; Ներկայացվել է 21.12.93; Հրապարակվել է 15.09.96, N1. - 1 էջ:
6. ՀՀ վկայական 245, ՄԱԴ[5] C 12 N 5/00, A 01 H 4/00. Մեխակի միկրոկլոնային բազմացման սնուցիչ միջավայր / *Հովհաննիսյան Ռ.Հ., Հովհաննիսյան Մ.Գ.* (ՀՀ). - N000180; Ներկայացվել է 21.12.93; Հրապարակվել է 01.11.96, N1. - 1 էջ:
7. *Макарян Е.М., Оганесян Р.Г. Барсегян А.А.* Разработка и модификация питательной среды для мериклонального размножения ремонтантной гвоздики. // Современные проблемы беспочвенного культивирования растений: Тез. докл. 2-ой междунар. конф. - Ереван, 1997. - С.98.
8. *Оганесян Р.Г.* Микроклональное размножение некоторых сортов ремонтантной гвоздики в культуре *in vitro*. // Сб. науч. тр. Науч. центра землед. и защиты раст. МСХ РА. - Эчмиадзин, 2000. - N4. - С. 26-29.
9. *Оганесян Р.Г., Арутюнян А.Г., Оганесян М.Г., Барсегян А.А., Саакян А.Д., Мелян Г.Г.* Регенерация *Kalanchoe pinnata* путем прямого органогенеза в культуре *in vitro*. // Сб. науч. тр. Науч. центра землед. и защиты раст. МСХ РА. - Эчмиадзин, 2000. - N4. - С. 39-41.

15.05.2014

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

In vitro հյուսվածքի կուլտուրայի մեթոդների կիրառումը հանդիսանում է ժամանակակից կենսատեխնոլոգիայի կարեւորագույն ուղղություններից մեկը: Մշակված տեխնոլոգիաների օգտագործումը թույլ կտա ստանալ տնտեսական կարեւոր բուսական կուլտուրաների առողջ տնկանյութ, ինչպես նաեւ կրճատել նրանց բազմացման ժամկետները:

Աշխատանքը նվիրված է մեխակ պարտեզի (*Dianthus caryophillus* L.) մերիստեմային ծագում ունեցող վիրուսազերծ տնկանյութի ստացման եւ կալանխոե փետրատերեւի (*Kalanchoe pinnata* L. Pers.) *in vitro* կուլտուրայում արագ բազմացման եղանակների ուսումնասիրությանն եւ մշակմանը: Մեխակը Հայաստանում հանդիսանում է առավել հանրաճանաչ զարդաբույսերից մեկը: Այդ կուլտուրայի ծառատունկերում մեխակի խայտուցավորության վիրուսի (ՄԽՎ) առկայությունը կտրուկ իջեցնում է վերջավոր արտադրանքի ստացվածքը: Կալանխոէն հանդիսանում է արժեքավոր դեղաբույս, որի հյութը լայն կիրառում է գտել բժշկական պրակտիկայում: Կալանխոէյի հյութի հիման վրա բուժիչ պրեպարատների արտադրության համար անհրաժեշտ է այդ կուլտուրայի կանաչ զանգվածի զգալի քանակությունը, որին դժվար է հասնել բազմացման ավանդական մեթոդներով:

Ցույց է տրվել, որ մերիստեմային հյուսվածքի *in vitro* կուլտիվացման եւ ջերմաթերապիայի զուգակցումը հանգեցնում է ուսումնասիրվող մեխակների տեսակների լիակատար առողջացմանը ՄԽՎ-ից: Մեխակի ռեգեներանտների *in vitro* կուլտուրայում ստացման համար մշակվել է նոր սնուցիչ միջավայր, որը 1,5 անգամ ավելի արդյունավետ է, քան թե լայն կիրառվող Մուրասիգե-Սկուգայի սնուցիչ միջավայրը:

In vitro կուլտուրայում ստացվել են կալանխոեի մանրաբույսեր- ռեգեներանտներ՝ ինչպես սոմատիկ էմբրիոգենեզի, այնպես էլ ուղղակի օրգանոգենեզի միջոցով: Ընտրվել է հռոմնալ ավելացումների ամենաբարենպաստ կազմը: Ցույց է տրվել, որ կալանխոեի բազմացման համար նախնականորեն *in vitro* կուլտուրայի մեջ մտցված մանրաբույսերի օրգանների մասերը որպես էքսպլանտ կիրառումը թույլ է տալիս 1,5 անգամ արագացնել սոմատիկ էմբրիոգենեզի եղանակով իրականացվող ռեգեներացիայի ընթացքը:

Մշակված տեխնոլոգիաների հիման վրա ստացվել է մոտ 70000 ներիստեմային ծագում ունեցող մեխակի վիրուսազերծ տնկաշիվ եւ մոտ 2000 կալանխոեի մանրաբույսեր:

© National Library of Armenia

Պատվեր 21 Տպաքանակ 70

Հայ Էդիթ ՍՊԸ
Երևան Բաղրամյան 24

© National Library of Armenia