

## БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА ПОЛУЧЕНИЯ РАСТЕНИЙ КАЛАДИУМА (*CALADIUM HORTULANUM* BIRDSEY.) ЧЕРЕЗ СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ И ОРГАНОГЕНЕЗ

И.В. МИТРОФАНОВА<sup>1</sup>, кандидат биологических наук;  
М.К. СОКОЛОВА<sup>2</sup>;

О.В. МИТРОФАНОВА<sup>1</sup>, доктор биологических наук;  
Н.Н. ИВАНОВА<sup>1</sup>, С.В. ЧЕЛОМБИТ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН

В настоящее время биотехнологические методы активно используются для размножения ряда декоративных растений [8, 16]. В качестве исходных эксплантов используют вегетативные почки, листья и другие органы донорных растений. Изучая пути морфогенеза растений в условиях *in vitro*, можно выявить определенные сходства или различия в регенерационном потенциале исследуемых органов и тканей и выделить оптимальные из них.

Каладиум (*Caladium hortulanum* Birdsey.) относится к семейству ароидных и очень популярен среди декоративных растений. Эту культуру в последние годы широко используют для озеленения зимних садов, а также в качестве водного растения в парках и садах в летний период. Однако, известно, что каладиум очень трудно размножается традиционными методами [7].

Первые работы по культуре тканей *C. hortulanum* появились в начале 70-х годов прошлого столетия, но касались они только изучения вирусов этой культуры и использования культуры меристем для оздоровления [13]. Отдельные публикации о разработке способа не прямой регенерации растений каладиума в условиях *in vitro* появились значительно позже [3, 12, 17]. Несколько лет назад американские ученые обратили внимание на возможности селекции *in vitro* каладиума. Они проростили пыльцу этого растения и научились в течение короткого времени сохранять ее в условиях *in vitro* [10]. Впервые изучением вопросов соматического эмбриогенеза *in vitro* каладиума начали заниматься в отделе биотехнологии и биохимии растений НБС-ННЦ [4]. Разработка данного способа размножения позволила получать полноценные растения шести сортов каладиума.

Однако результаты всех работ, проводимых с культурой каладиума, показали, что до сих пор не выявлены морфогенетические потенции органов и тканей различных сортов каладиума в условиях *in vitro* и соответственно не разработаны эффективные биотехнологические системы регенерации этого трудноразмножаемого растения.

Целью настоящего исследования было изучение возможных путей регенерации растений каладиума (*C. hortulanum*) в условиях *in vitro* через соматический эмбриогенез и органогенез с последующей разработкой способа микроразмножения *in vitro* данной культуры.

### Материалы и методы

Исследования по культуре органов и тканей каладиума выполняли на базе отдела биотехнологии и биохимии растений Никитского ботанического сада – Национального научного центра в 2001-2005 гг. Гистохимические исследования проведены в лаборатории физиологии растительной клетки Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН (г. Саратов, Россия).

Для исследований были отобраны два сорта:

а) сорт Pink Gem – среднерослый, черешок листа полосатый, лист темно-зеленый с бело-красной окантовкой и прожилками. Растение достаточно кустистое, образует в среднем 10 листьев размером до 20 см в длину и до 10-15 см в ширину. Период вегетации – с апреля по ноябрь;

б) сорт *Triumphe de Compte* – сильнорослый, черешок листа темно-коричневый, пятнистый, лист темно-зеленый с красными прожилками и белыми пятнами. Растение образует 3-4 листа размером 35 см в длину и 25 см в ширину. Период вегетации – с апреля по октябрь.

В качестве исходных эксплантов были использованы листья с черенками с 2-3-летних растений, выращиваемых в закрытом грунте из коллекции НБС–ННЦ, которые отбирали в период с мая по сентябрь.

Для стерилизации растительных эксплантов использовали различные антисептики, такие как 70%-ный этиловый спирт ( $C_2H_5OH$ ), 1% и 1,8%-ные растворы гипохлорита натрия ( $NaClO$ ), 0,08%-ный раствор  $AgNO_3$ , 1%-ный раствор Thimerosal (*Sigma*, США). Эффективность стерилизации повышали за счет добавления в стерилизующие растворы детергента Tween-80 (2-3 капли).

Работу по вычленению первичного экспланта проводили в ламинарных боксах марки «Fatran Lf» (Чехия).

Для культивирования эксплантов использовали питательную среду, содержащую минеральные соли по прописи Мурасиге и Скуга (МС) [15]. Во все питательные среды добавляли 554,93 мкМ мезоинозита, 0,1 мкМ тиамин-НСl, 2,43 мкМ пиридоксина-НСl, 4,06 мкМ никотиновой кислоты, 3% сахарозы, 0,8% агара. рН среды доводили до показателя 5,6.

Для регулирования регенерационных процессов *in vitro* каладиума в питательную среду добавляли 1,36-5,56 мкМ зеатина, 1,0-9,0 мкМ тидиазурона (ТДЗ, *Sigma*, США), кинетин (*Sigma*, США) в концентрации 1,39-4,60 мкМ и 5,37 мкМ  $\alpha$ -нафтилуксусной кислоты (НУК, *Sigma*, США), 6-бензиламинопурин (БАП, *Sigma*, США) в концентрации 0,89-4,40 мкМ и 1,07-5,37 мкМ НУК, 0,98-2,48 мкМ  $\beta$ -индолил-3-масляной кислоты (ИМК, *Sigma*, США).

Высечки листа культивировали в термостате при температуре 25 °С в отсутствие освещения, а также в культуральной комнате на свету при постоянной температуре 24±1 °С, интенсивности освещения 40 мкМ м<sup>-2</sup> с<sup>-1</sup> и 16-часовом фотопериоде.

Субкультивирование тканей и органов проводили через 30 суток. Каждый эксперимент был поставлен трижды в 10-кратной повторности.

Для приготовления препаратов растительную ткань фиксировали в растворах 2,5% глутарового альдегида с 2% формальдегидом, затем пропитывали пропиленгликолем при –20 °С, после чего заливали в ПЭГ-1500 [2, 5, 6].

Срезы получали с использованием микротомы «МС-2» (Россия) толщиной 5 и 10 микрон. При окраске акридиновым оранжевым: срезы доводили до воды; на срезы наносили 0,1%-ный водный раствор акридинового оранжевого на 2–3 мин; промывали дистиллированной водой. При окраске толуидиновым синим: срезы окрашивали 0,5%-ным водным раствором толуидинового синего (2–3 мин); промывали в дистиллированной воде. При окраске DAPI – 4',6-Diamidino-2-Phenyl-Indole. (*Sigma*, США) – флуоресцентный краситель на ядерную ДНК: срезы доводили до воды; окрашивали DAPI в течение 10 мин; промывали дистиллированной водой. Затем срезы подсушивали и заключали в синтетическую среду DePex (*Serva*, Германия).

Препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа «Leica DMLB» (Германия).

### Результаты и обсуждение

Известно, что правильный выбор первичного экспланта, способа стерилизации, применение экзогенных регуляторов роста, условия культивирования позволяют регулировать морфогенетические процессы в культуре органов и тканей и получать желаемый результат. В качестве первичных эксплантов были использованы высечки листа и сегменты черешков каладиума сортов *Pink Gem* и *Triumphe de Compte*. Отбор листьев с черешками исследуемых сортов каладиума, а также их введение в культуру *in vitro* проводили с началом появления нормальных листьев взрослого растения (май) и в период его вегетации по сентябрь включительно. Было установлено, что листья, отобранные в период с мая по июль, были наиболее морфогенными, при этом частота образования соматических зародышей достигала 86-100% (рис. 1). В последующие месяцы этот показатель значительно снижался.



Рис. 1. Зависимость частоты образования соматических зародышей каладиума сортов Pink Gem и Triumphe de Compte от времени отбора исходного экспланта

Одной из основных проблем, препятствующих успешному применению биотехнологических методов в размножении растений, является стерилизация исходного растительного материала эксплантов для получения асептической культуры. Трудности, возникающие при стерилизации, преодолеваются чаще всего за счет повторной стерилизации, предварительно проверяя экспланты на зараженность сапрофитной микрофлорой, или в питательные среды вводят антибиотики [11]. Нам удалось освободить исходный материал от экзогенной бактериальной и грибной инфекции, применяя метод последовательной стерилизации в 1,8%-ном растворе гипохлорита натрия (5 мин) и 70%-ном этаноле (1 мин). В таблице 1 представлены результаты исследований по стерилизации исходного материала каладиума с помощью различных антисептиков. Увеличение экспозиции при обработке в 1,8%-ном растворе NaClO до 10 мин приводило к 100%-ной стерилизации эксплантов, однако в дальнейшем такие экспланты не развивались. Присутствие в качестве антисептиков нитрата серебра и Thimerosal способствовало выходу  $79,3 \pm 5,3\%$  стерильных эксплантов, однако их воздействие вызывало сильный ожог тканей, что значительно снижало их морфогенетический потенциал и последующую частоту регенерации микропобегов.

Таблица 1

**Результаты стерилизации эксплантов каладиума сортов Pink Gem и Triumphe de Compte**

Способ стерилизации	Количество эксплантов, свободных от контаминации, %
1% NaClO (5 мин) → 70% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (1 мин)	47,2 ± 8,4
1% NaClO (10 мин) → 70% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (1 мин)	78,6 ± 6,3
1,8% NaClO (5 мин) → 70% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (1 мин)	96,5 ± 10,7
1,8% NaClO (10 мин) → 70% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (1 мин)	100,0 ± 0,0
70% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (1 мин) → 1% Thimerosal (20 мин) → 0,08% AgNO <sub>3</sub> (2 мин)	26,3 ± 1,9
70% C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH (1 мин) → 1% Thimerosal (20 мин) → 0,08% AgNO <sub>3</sub> (3 мин)	79,3 ± 5,3

В процессе исследования был модифицирован состав питательной среды MC (C1) и подобраны оптимальные концентрации цитокинина для индукции морфогенетических процессов в тканях листа, приводящих к соматическому эмбриогенезу. Нами было отмечено, что использование зеатина не оказывало индуцирующее действие как на процессы дедифференциации, так и дифференциации тканей листа. В присутствии ТДЗ формировался

рыхлый каллус по периметру высежки листа. Среди испытанных концентраций кинетина оптимальной оказалась 2,32 мкМ, при которой формировались соматические зародыши на 66,67% и 70,78% листовых дисков у сортов Pink Gem и Triumphe de Compte соответственно (табл. 2). Повышение концентрации кинетина до 3,25 мкМ в два раза уменьшало количество эксплантов, способных к соматическому эмбриогенезу. Дальнейшее повышение концентрации кинетина индуцировало активное каллусообразование по краю культивируемых эксплантов.

Таблица 2

**Образование соматических зародышей в культуре листовых дисков и черешков двух сортов каладиума на средах С1, дополненных различными концентрациями кинетина и 5,37 мкМ НУК**

Концентрация кинетина, мкМ	К-во эксплантов с соматическими эмбриоидами, %			
	культура листовых дисков		культура черешков	
	Pink Gem	Triumphe de Compte	Pink Gem	Triumphe de Compte
1.39	7,80 ± 2,83	14,33 ± 3,69	6,54 ± 2,61	12,56 ± 3,49
2,32	66,67 ± 6,11	70,78 ± 5,86	50,00 ± 6,25	41,68 ± 6,42
3,25	32,22 ± 4,93	38,09 ± 5,12	20,80 ± 4,28	20,92 ± 4,29
4,60	14,29 ± 3,69	18,73 ± 4,11	8,28 ± 3,60	5,00 ± 2,80

Вычлняя высежки листа размером 10 x 10 мм из разных зон только что раскрывшейся листовой пластинки и помещая их на питательную среду с кинетином, удалось определить наиболее морфогенные зоны, способные к прямому и непрямому соматическому эмбриогенезу. Это зоны соединения листовой пластинки с черешком и край высежки листа (рис. 2).

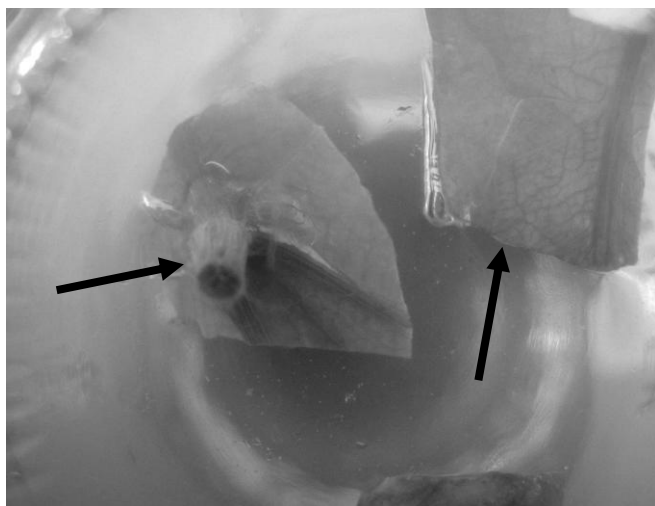


Рис. 2. Зоны листовой пластинки каладиума, способные к морфогенезу в условиях *in vitro*

Период развития от введения первичных эксплантов обоих сортов каладиума в культуру до появления глобулярных структур по краю высежки листа без этапа каллусообразования составил 30 суток (рис. 3, а, б).

В процессе исследований было также установлено, что путь реализации морфогенетического потенциала эксплантов зависел от условий культивирования. Так, в термостате формировались только соматические зародыши. Образование 2-3 корней в процессе развития эмбриоида было его отличительной особенностью (рис. 4).

Из таблицы 3 видно, что корни активно развивались как у сорта Pink Gem, так и Triumphe de Compte. Особых различий в количестве и длине корней у соматических зародышей, образовавшихся из высежек листа и сегментов черешка, отмечено не было. Однако корни у эмбриоидов, развивающихся из листа, были мощнее и имели корневые волоски.

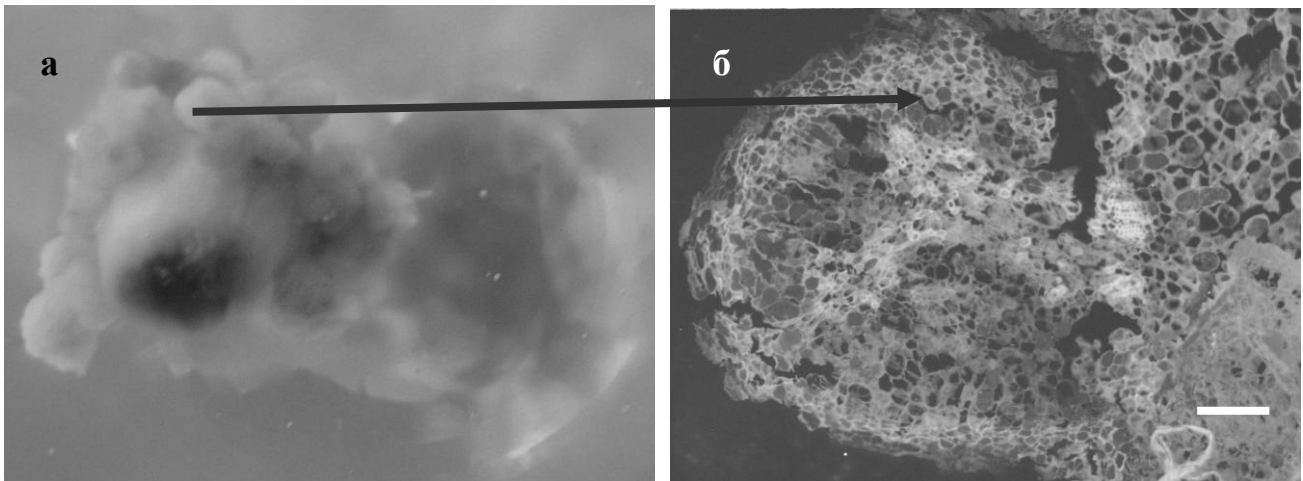


Рис. 3. Формирование глобулярных эмбрионов в эпидермальной части высечки листа каладиума: а) глобулярные структуры в зоне черешка; б) микрофотография проэмбрио (10 микрон)



Рис. 4. Развитие 2-3 корней у соматических зародышей каладиума при культивировании в темноте

Таблица 3

**Развитие корней соматических зародышей двух сортов каладиума на среде С1, дополненной 2,32 мкМ кинетина и 5,37 мкМ НУК после культивирования в термостате при температуре 25 °С**

Сорт	Культура листовых дисков		Культура черешков	
	среднее к-во корней / эмбрионд, шт.	средняя длина корней, см	среднее к-во корней / эмбрионд, шт.	средняя длина корней, см
Pink Gem	2,85 ± 0,25	1,85 ± 0,24	2,00 ± 0,24	1,45 ± 0,22
Triumphe de Compte	3,00 ± 0,27	2,40 ± 0,25	2,20 ± 0,20	2,10 ± 0,21

На свету происходило три морфогенетических процесса: органогенез в морфогенном каллусе, не прямой и прямой соматический эмбриогенез. В зоне соединения листовой пластинки с черешком эмбриогенные структуры появлялись непосредственно в эпидермальной и субэпидермальной зоне высечки листа (рис. 5). В течение последующих 30 суток наблюдали развитие полноценных соматических зародышей (рис. 6). В присутствии

кинетина в питательной среде С1 в концентрации 2,32 мкМ и 5,37 мкМ НУК среднее количество соматических эмбриоидов на эксплант достигало  $10 \pm 1,4$  штук.

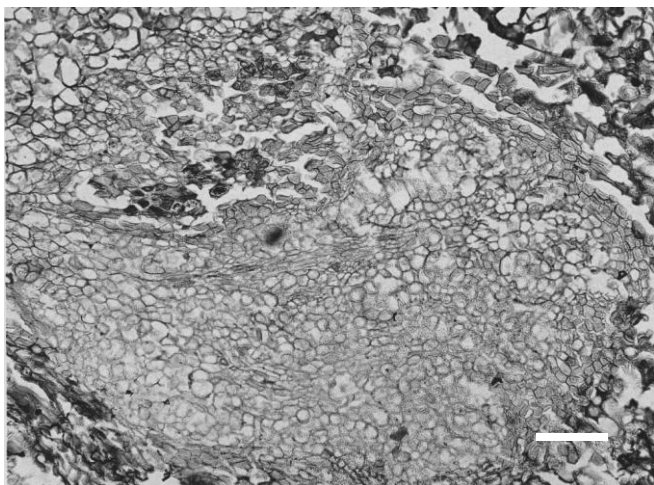


Рис. 5. Развитие соматического зародыша каладиума в субэпидермальной зоне высечки листа

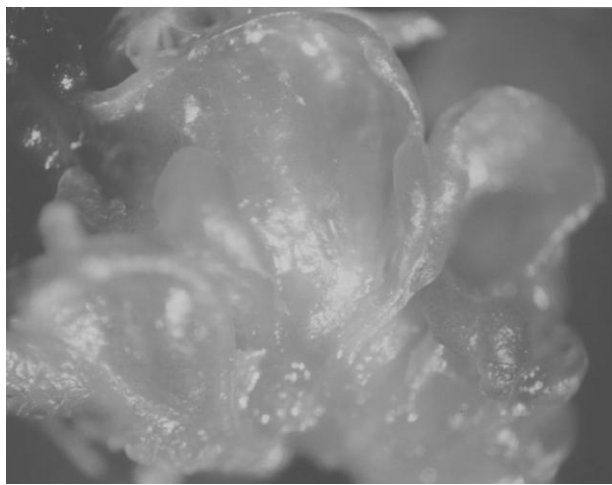


Рис. 6. Соматические зародыши каладиума на питательной среде С1

Последующие passages соматических зародышей на питательную среду С1 индуцировали вторичный эмбриогенез. Вторичные эмбриоиды формировались непосредственно на первичных соматических зародышах. На рисунке 7 показан процесс образования вторичного эмбриоида, в то время как первичный начинает прорастать на поверхности высечки листа. На рисунке хорошо видно, что зародыш состоит из активно делящихся клеток.

В процессе исследований было отмечено, что на индукционной среде растения развивались очень медленно, поэтому для массового образования растений из эмбриоидов концентрацию НУК уменьшали в 10 раз. При таких условиях частота регенерации не уменьшалась и развивались полноценные растения (рис. 8). Весь процесс от введения эксплантов до регенерации растений составил 3 месяца.

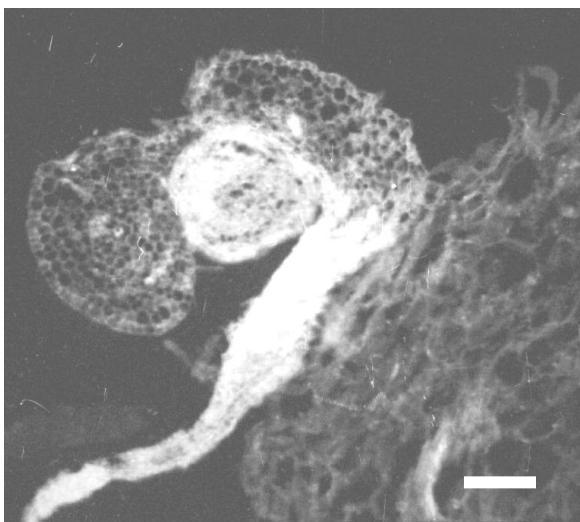


Рис. 7. Вторичный эмбриогенез каладиума на питательной среде С1



Рис. 8. Регенеранты каладиума, полученные из соматических зародышей через прямой эмбриогенез

Из литературных данных известно, чтобы вызвать прямую и непрямую регенерацию растений из листовых эксплантов очень часто используют питательные среды, в которых соотношение ауксина и цитокинина равняется 1:1 [1, 9, 14].

При культивировании высечек листа каладиума на средах с БАП и НУК соматические зародыши формировались в каллусе, образовавшемся по краю высечки листа. Наряду с этим, было отмечено различие в особенностях органогенеза двух сортов каладиума. Так, меристемоиды, из которых затем развивались адвентивные почки, у сорта *Pink Gem* формировались в образующемся каллусе. При этом у сорта *Triumphe de Compte* адвентивные почки развивались непосредственно по краю высечки листа без этапа каллусообразования. В результате проведенных исследований установлены оптимальные концентрации фитогормонов (2,22 мкМ БАП и 2,69 мкМ НУК – питательная среда С2), индуцирующие образование максимального количества микропобегов и эмбриоидов (табл. 4). Увеличение концентрации фитогормонов приводило к снижению регенерационного потенциала и оводнению образовавшихся микропобегов.

Таблица 4

**Регенерация микропобегов и соматических зародышей каладиума на средах с БАП и НУК**

Концентрация БАП и НУК, мкМ	Среднее к-во микропобегов на эксплант, шт.		Среднее к-во соматических эмбриоидов на эксплант, шт.	
	<i>Pink Gem</i>	<i>Triumphe de Compte</i>	<i>Pink Gem</i>	<i>Triumphe de Compte</i>
0,89 + 1,07	0	1,5 ± 0,5	0	0
2,22 + 2,69	13,7 ± 4,3	15,5 ± 3,5	3,6 ± 0,2	7,2 ± 1,3
3,55 + 4,30	7,9 ± 2,6	9,5 ± 1,5	2,8 ± 0,4	6,2 ± 0,6
4,40 + 5,37	2,6 ± 0,3	3,0 ± 0,6	1,3 ± 0,3	3,5 ± 0,3

В том случае, когда путь развития экспланта реализовался через органогенез, в течение 20-30 суток на эксплантах образовывался компактный каллус светло-зеленого цвета. После этапа каллусообразования через 14 суток культивирования отмечали появление меристемоидов. На 21 сутки регенерировали микропобеги (рис. 9), а в течение последующих 14 суток появлялись корни и развивались полноценные растения (рис. 10). После отделения каллуса от регенерантов и их декапетирования, в их основании активно закладывались адвентивные почки. Количество адвентивных микропобегов достигало в среднем 15-20 штук на эксплант.

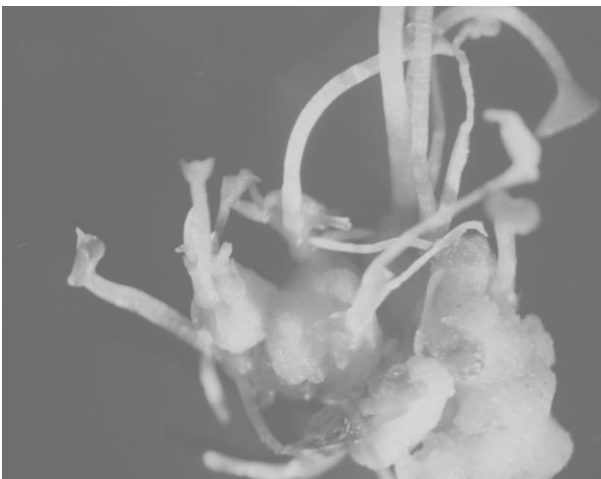


Рис. 9. Регенерация микропобегов в каллусе каладиума на 21 сутки культивирования высечек листа



Рис. 10. Регенеранты каладиума, полученные в результате органогенеза из высечек листа

Образование соматических зародышей в эмбрионном каллусе также происходило на питательной среде С2. Однако появление эмбриоидов было отмечено на 7 сутки после образования каллуса. При таком способе формирования эмбриоидов для глобулярных зародышей была характерна более насыщенная зеленая окраска. Процесс формирования

соматических зародышей был асинхронный: в одно и тоже время появлялись новые эмбриониды и развивались растения (рис. 11). Регенеранты легко отделялись от самого каллуса и их высаживали на адаптацию *in vivo* или доращивали на питательной среде с 0,02 мкМ НУК.

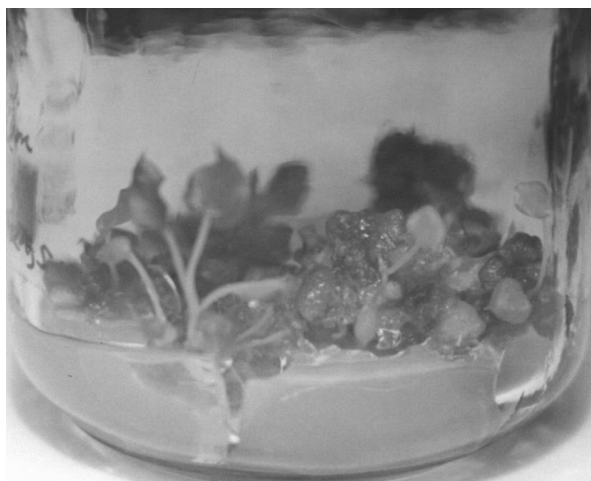


Рис. 11. Развитие растений в эмбриогенном каллусе каладиума

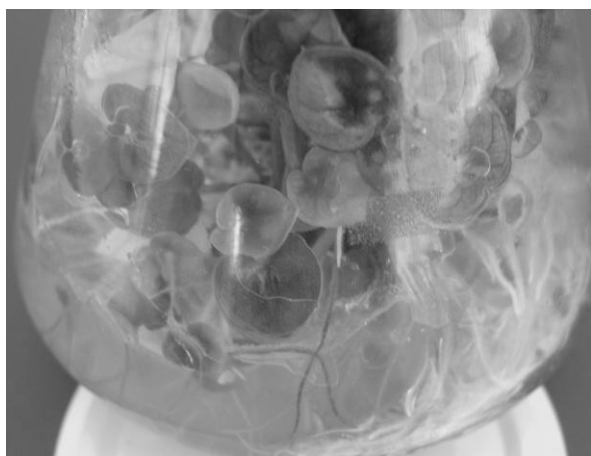


Рис. 12. Растения каладиума перед высадкой на адаптацию *in vivo*

Путем прямой регенерации микропобегов при последовательных субкультивированиях из одного экспланта в течение года можно получить до  $5 \cdot 10^6$  микропобегов. Для укоренения микропобегов каладиума использовали ИМК в концентрации 0,98-2,48 мкМ. Среднее количество корней на эксплант достигало 4,5 штук (рис. 12).

В результате соматического эмбриогенеза из одной высадки листа можно получить более  $10 \cdot 10^6$  растений, исключая затраты на стадию укоренения.

На адаптацию растения высаживали как группами, так и отдельно в кассеты объемом 100 мл фирмы «ENGO» (Дания) и накрывали полиэтиленовыми изоляторами, которые не снимали с растений в течение 2-3 недель. Это было обусловлено необходимостью 100% относительной влажности на этапе перехода растения из условий *in vitro* в условия *in vivo*. Затем изоляторы постепенно снимали на 20-30 мин, снижая влажность до 80%. Несоблюдение этих требований приводило к 80-90% гибели регенерантов в условиях *in vivo*.

Было установлено, что растения начинали расти полностью без изоляторов через 5 недель адаптации после высадки в субстрат. Количество адаптированных растений зависело, прежде всего, от состава стерильного субстрата, в который

высаживали регенеранты из условий *in vitro* (табл. 5).

Таблица 5

**Результаты адаптации пробирочных растений двух сортов каладиума на различных стерильных субстратах**

Тип стерильного субстрата	К-во адаптированных растений, %	
	Pink Gem	Triumphe de Compte
торф:песок (3:1)	90,67 ± 0,75	94,42 ± 0,76
торф:песок (2:1)	64,51 ± 1,44	75,87 ± 2,45
торф:песок (1:1)	25,37 ± 0,75	28,30 ± 0,21
торф:лиственная земля:песок (1:1:1)	44,11 ± 0,93	40,13 ± 0,75
перлит	90,44 ± 0,47	96,02 ± 1,79



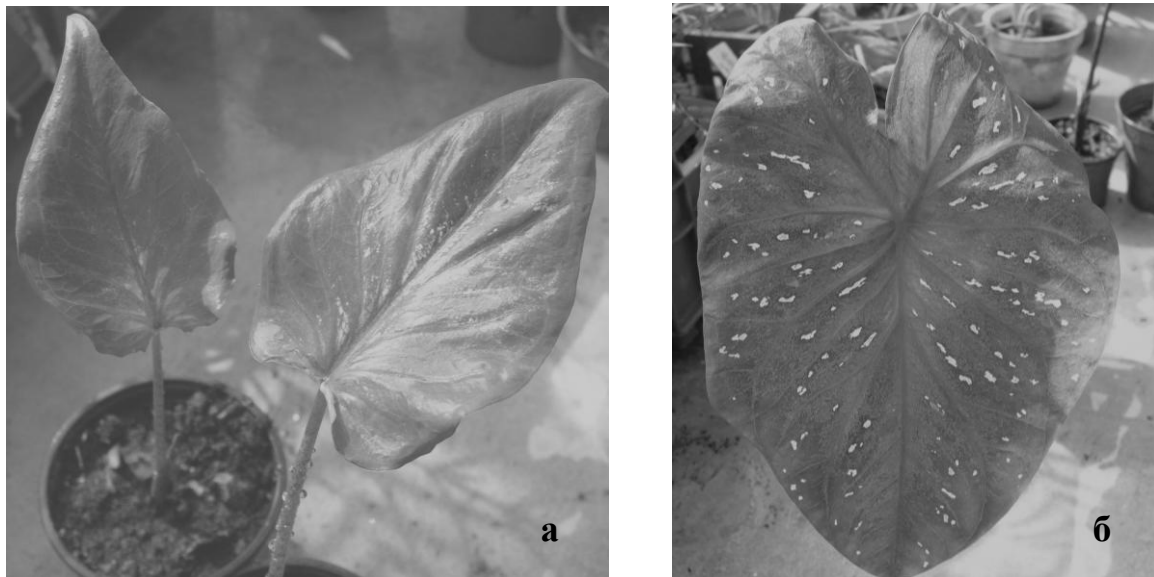


Рис. 13. Адаптированное растение каладиума сорта Triumph de Compte: а) через месяц после адаптации; б) через 4 месяца после адаптации

Эффективность адаптации регенерантов каладиума в торфе и песке (3:1), а также в перлите составила 90–96%. Сорт каладиума Triumph de Compte, высаженный на адаптацию в марте, через 4 месяца достигал стандартных размеров: высота растения около 30 см, длина листа 20–25 см, ширина листа 15–17 см (рис. 13).

Таким образом, нами установлены оптимальные сроки отбора листьев каладиума (май–июль) для введения в условия *in vitro*. Показано, что в результате применения 1,8%-ный раствора гипохлорита натрия (5 мин) и 70%-ного этанола (1 мин) получено 96,5% эксплантов, свободных от контаминации. На основе изучения действия экзогенных факторов (кинетина и НУК) на реализацию морфогенетического потенциала высечек листа сортов каладиума Triumph de Compte и Pink Gem определены основные пути регенерации растений и разработаны биотехнологические системы соматического эмбриогенеза и органогенеза в условиях *in vitro*.

На схеме представлены 4 пути получения регенерантов каладиума (рис. 14).

**Первый путь** – прямой соматический эмбриогенез, включающий в себя ряд последовательных этапов: а) индукция образования соматических зародышей из клеток, детерминированных к образованию биполярных структур на питательной среде С1, дополненной 2,32 мкМ кинетина и 5,37 мкМ НУК в термостате при температуре 25 °С; б) прорастание соматических зародышей и развитие растений, на среде С1 с уменьшенной в 10 раз концентрацией НУК; в) прямой вторичный эмбриогенез из соматических зародышей и из основания проростков; г) регенерация растений на той же среде, что и индукция развития эмбриоидов.

**Второй путь** – непрямой соматический эмбриогенез, при котором клетки высечки листа, культивируемые на питательной среде С2 с 2,22 мкМ БАП и 2,69 мкМ НУК, на свету сначала дедифференцировались, образуя каллус, затем дифференцировались и в каллусе начинался процесс образования соматических зародышей. Из эмбриоидов образовывались полноценные растения на среде С2, дополненной 2,22 мкМ БАП и 0,02 мкМ НУК.

**Третий путь** – прямая регенерация микропобегов у сорта Triumph de Compte происходила также на свету на питательной среде С2, содержащей 2,22 мкМ БАП и 2,69 мкМ НУК. Укоренение микропобегов осуществляли на среде ½ МС, дополненной 0,98–2,48 мкМ ИМК.

**Четвертый путь** – непрямая регенерация микропобегов у сорта Pink Gem. На среде С2 с 2,22 мкМ БАП и 2,69 мкМ НУК на свету сначала формировался морфогенный каллус, а затем закладывались меристемоиды и развивались адвентивные микропобеги. Укоренение

микропобегов осуществляли на той же среде, что и в случае третьего пути регенерации. Все четыре пути регенерации растений каладиума заканчивались адаптацией пробирочных растений *in vivo*.

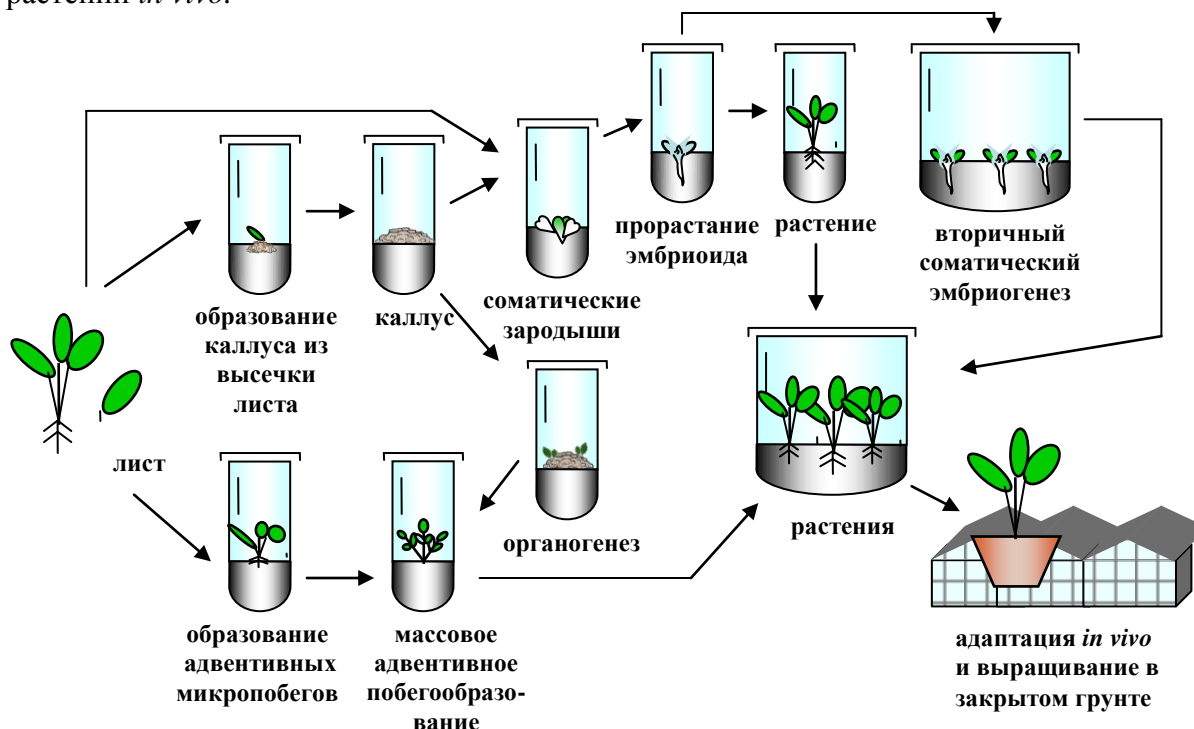


Рис. 14. Биотехнологическая схема регенерации растений каладиума в условиях *in vitro*

Сравнительная характеристика результатов традиционного размножения и микроразмножения в условиях *in vitro* представлена в таблице 6. Как видно из таблицы, регенерация растений каладиума *in vitro* позволяет получать значительно больше растений по сравнению с традиционным размножением. По нашему мнению, наиболее эффективным среди четырех вышеуказанных путей регенерации растений каладиума является первый, в котором происходят последовательно два процесса: прямой первичный и вторичный соматический эмбриогенез. Так, количество растений в год, при использовании первого пути регенерации *in vitro*, составляет 40.000.000 штук, а при традиционном – 1-2 штуки от одного растения.

Таблица 6

### Результаты размножения растений каладиума

Путь регенерации*	Исходный эксплант	К-во растений, полученных из одного экспланта в условиях <i>in vitro</i> , шт.	К-во растений в год при размножении <i>in vitro</i> , шт.	К-во растений в год при традиционном размножении, шт.
1	лист	10	40 000 000	1-2
2		7	10 000 000	
3		15	20 000 000	
4		3	5 000 000	

\* 1 – прямой соматический эмбриогенез; 2 - непрямой соматический эмбриогенез; 3 - прямая регенерация микропобегов; 4 – непрямая регенерацию микропобегов

Все растения, полученные из высечек листа через прямой соматический эмбриогенез и прямой органогенез и выращиваемые в теплице, фенотипически не отличались от донорных. Наряду с этим, как результат непрямого соматического эмбриогенеза у сорта *Triumphe de Compte*, непрямой регенерации микропобегов и непрямого соматического

эмбриогенеза у сорта Pink Gem, были получены новые формы с различными соматическими мутациями, которые были выделены при выращивании растений в закрытом грунте. У выделенных форм соматические мутации проявлялись в виде различных форм листовой пластинки, ее окраски и жилковании.

### Список литературы

1. Виджешвар П., Митрофанова О.В., Лищук А.И. Клональное микроразмножение актинидии превосходной [*Actinidia deliciosa* (Chev.) Liang, Ferguson] // Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур. Сб. науч. трудов / Никит. ботан. сад. – 1997. – Т. 119. – С. 111-126.
2. Дженсен У. Ботаническая гистохимия. – М.: Мир, 1965. – 374 с.
3. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. – Киев: Наукова думка, 1992. – 232 с.
4. Митрофанова И.В., Соколов О.И., Митрофанова О.В., Иванова Н.Н. Пути реализации морфогенетического потенциала каладиума (*Caladium hortulanum* Birdsey.) и цветной каллы (*Zantedeschia hybrida*) в условиях *in vitro* // Біологічний вісник. – 2006. – Т. 10, № 1. – С. 64-67.
5. Пирс Э. Гистохимия. – М.: Иностранная литература, 1962. – 962 с.
6. Прозина М.Н. Ботаническая микротехника. – М.: Высшая школа, 1960. – 205 с.
7. Чуб В., Лезина К. Все о комнатных растениях. – М.: ЭКСМО-Пресс, 2002. – 336 с.
8. Biotechnology of Ornamental Plants / Eds. R.L. Geneve, J.E. Preece, S.A. Merkle. – Wallingford: CAB International, 1997. – 412 p.
9. Caboni E., Tonelli M.G. Effect of 1,2-benzisoxazole-3-acetic acid on adventitious shoot regeneration and *in vitro* rooting in apple // Plant Cell Rep. – 1999. – Vol. 18, N 12. – 985-988.
10. Deng Z., Harbaugh B.K. Technique for *in vitro* pollen germination and short-term pollen storage in caladium // HortSci. – 2004. – Vol. 39. – P. 365-367.
11. Dodds J.H., Roberts L.W., Heslop-Harrison J. Experiments in Plant Tissue Culture. 3<sup>rd</sup> Ed. – UK: Cambridge University Press., 1995. – 272 p.
12. Gliozeris S., Tamosiunas A., Stuopyte L. Effect of BAP and 2,4-D on *in vitro* regeneration of some cultivars of *Caladium hortulanum* // Plant Tissue Culture: Abstracts 4<sup>th</sup> Intl. Conf. (1-3 Nov. 2001, Dhaka). – Dhaka, 2001. – P. 26.
13. Hartman R.D. Dasheen mosaic virus and other phytopatogen eliminated from caladium, taro and cocoyam by culture of shoot tips // Phytopath. – 1974. – Vol. 64. – P. 237-240.
14. Mathews V.H., Rangan T.S. Growth and regeneration in callus cultures of pineapple // Sci. Hort. – 1981. – Vol. 14, N 3. – P. 227-234.
15. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15, N 3. – P. 473-497.
16. Naik P.K., Nayak S. Different modes of plant regeneration and factors affecting *in vitro* bulbet production in *Ornithogalum virens* // Science Asia. – 2005. – Vol. 31. – P. 409-414.
17. Tamosiunas A., Gliozeris S., Stuopyte L. Prospects for micropropagation of *Caladium* as pot plants production // Plant Tissue Culture: From Theory to Practice: Abstracts Intl. Conf. of Baltic States (27-28 May 2004, Salaspils, Latvia). – Salaspils, 2004. – P. 61.

### **Biotechnological system of caladium (*Caladium hortulanum* Birdsey.) plants obtaining via somatic embryogenesis and organogenesis**

**Mitrofanova I.V., Sokolova M.K., Mitrofanova O.V., Ivanova N.N., Chelombit S.V.**

On the basis of somatic embryogenesis and organogenesis of caladium the biotechnological system of plants obtaining regeneration has been developed. Influence of kinetin and BAP concentration on inducing of somatic embryo and adventive buds formation has been investigated. The adaptation conditions *in vivo* of plants have been demonstrated.