УДК 635.914:57.085.2

МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ДЕКОРАТИВНЫХ КУЛЬТУР

Н.Н. ИВАНОВА, И.В. МИТРОФАНОВА, О.В. МИТРОФАНОВА

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр, г. Ялта

Приведены результаты комплексных исследований морфогенеза в культуре *in vitro* эксплантов *B. riger elatior, C. hortulanum* и *S. ionantha* для разработки способов клонального микроразмножения исследуемых сортов. Выявлены типы и размеры эксплантов, зависимость морфогенетических реакций от генотипа. Установлены особенности гормональной регуляции морфогенеза *in vitro* и подобраны оптимальные концентрации регуляторов роста в питательной среде для этапов индукции развития эксплантов, регенерации микропобегов и их укоренения.

Ключевые слова: *B. riger elatior, C. hortulanum, S. ionantha морфогенез, регенерация, ризогенез, адаптация*.

Введение

Среди декоративных растений особый интерес представляют *Begonia riger elatior, Caladium hortulanum* Birdsey. и *Saintpaulia ionantha* Wendl., отличающиеся высокой декоративностью, длительностью цветения, большим разнообразием форм и окрасок. В результате успешной селекции получено множество гибридных форм этих растений, что также способствовало их широкому распространению. Для удовлетворения растущего спроса на цветочно-декоративные растения недостаточно использования только традиционных подходов в размножении и селекции этих культур.

Сегодня во многих научных лабораториях мира разработаны и применяются биотехнологии получения и размножения для целого ряда видов культурных растений [58, 95]. Наряду с этим необходимо отметить, что цветочно-декоративные растения, как правило, относятся к различным, отдаленным друг от друга ботаническим таксонам и значительно отличаются уровнем тотипотентости клеток и регенерационным потенциалом. Поэтому необходим методический подход к проводимым биотехнологическим исследованиям, что позволяет разрабатывать и усовершенствовать способы регенерации растений. При оптимизации биотехнологий массового производства декоративных культур важно обеспечить экономическую эффективность используемых методов за счет удешевления состава питательных сред, сокращения этапов размножения и увеличения выхода адаптированных растений высокого качества.

Исходя из вышеизложенного целью наших исследований была разработка методических приемов клонального микроразмножения *B. riger elatior, C. hortulanum* и *S. ionantha.*

Объекты и методы исследований

В качестве объектов исследований нами были отобраны растения 5 сортов *B. riger elatior,* 4-х сортов *C. hortulanum* и 6 гибридных форм *S. ionantha.* При разработке методических подходов к клональному микроразмножению растений в условиях *in vitro* необходимо рассматривать ряд факторов: генотип (исходные растения); условия асептики; подбор питательных сред и регуляторов роста, влияющих на процессы морфогенеза *in vitro* на разных этапах регенерации; физические факторы культивирования.

При разработке методов микроразмножения исследуемых нами культур в качестве эксплантов используют сегменты соцветий и высечки листа у *B. riger elatior*, высечки листа у *S. ionantha* и *C. hortulanum.* Листья отбирают с растений, выращиваемых в условиях закрытого грунта при невысокой влажности и ограниченном поливе.

Для изучения регенерационной способности исследуемых культур отбор эксплантов проводят на протяжении всего периода вегетации растений.

В работе придерживаются как общепринятых в биотехнологии методов [1, 6], так и методов, разработанных в лаборатории биотехнологии и вирусологии растений НБС-ННЦ [13]. Стерилизацию растительного материала и его введение в изолированную культуру проводятв ламинарных боксах марки Fatran Lf (Чехия) и БП 4-004 (Украина).

Условия стерилизации исходного растительного материала определяют экспериментально для каждой исследуемой культуры. При этом учитывают происхождение экспланта. Также отрабатываются концентрации и экспозиции стерилизующего реагента. В качестве стерилизующих веществ для освобождения от эндогенной или экзогенной инфекции применяют 1-2%-ный растворы гипохлорита натрия NaClO, 70%-ный этиловый спирт – C_2H_5OH, 0,08%-ный раствор нитрата серебра $AgNO_3$, которые освобождают изолированные экспланты от экзогенной и эндогенной инфекции.

Экспланты культивируют на модифицированных нами питательных средах, состав которых представлен в разделе «Результаты и обсуждение». Для индукции морфогенеза в качестве регуляторов роста используют кинетин, 6-бензиламинопурин (БАП), α–нафтилуксусную кислоту (НУК), индолил-3-уксусную кислоту (ИУК), индолил-3-масляную кислоту (ИМК). Стерилизацию питательных сред осуществляют в автоклаве при давлении 0,7-0,8 атм. в течение 20-25 мин.

Культуральные сосуды с изолированными эксплантами помещают в климатическую комнату с температурой 22-25ºС, 16-часовым фотопериодом, интенсивностью освещения 2-3 клк. Инфицированные и погибшие экспланты удаляют, а жизнеспособные переносят на среду для дальнейшего культивирования. Субкультивирование эксплантов проводят через 3-4 недели. Учитывают количество регенерировавших микропобегов с одного экспланта, количество укорененных микропобегов и адаптированных регенерантов. Статистическую обработку полученных данных проводят с помощью программы «Математическая статистика», версия 6.0.

Результаты и обсуждение

Успехи, достигнутые в области культивирования клеток, органов и тканей растений, привели к разработке эффективных методов размножения в условиях *in vitro*, которые позволяют быстро и в больших количествах получать растения, идентичные исходным генотипам [95]. Наряду с этим появилась возможность изучения в контролируемых условиях генетики соматических клеток растений, физиологических основ клеточного размножения, роста и дифференциации.

Большую роль в разработке микроразмножения видов и сортов растений сыграли исследования, проведенные в разных странах в 50-60 годы XX века по культивированию изолированных меристем различных растений. Первые работы в области микроразмножения декоративных культур были проведены в конце 50-х годов XX века французским ученым, руководителем лаборатории физиологии растений Национального центра агрономических исследований в Версале Жоржем Морелем [43]. Культивируя *in vitro* меристему цимбидиума (*Cymbidium*) размером 0,5 мм, состоящую из конуса нарастания и двух-трех листовых примордиев, Морель наблюдал

формирование сферических тел, так называемых протокормов, в базальной части которых развивался корень, а апикальной – листовые примордии. Эти структуры можно было делить, продолжая размножать новые клоны. При дальнейших многочисленных делениях дочерних протокормов цимбидиума формировалось множество новых эксплантов, из которых затем регенерировали целые растения.

В зависимости от характера процессов морфогенеза, происходящих в культуре *in vitro*, различные исследователи выделяют несколько основных типов клонального микроразмножения. В 1974 году Т.Мурасиге [45] выделил три этапа регенерации растений *in vitro*. Этап 1 – выбор оптимального эксплантa, его стерилизация и культивирование на питательной среде определенного состава. Этап 2 – микроразмножение данного генотипа путем развития пазушных меристем, индукции образования адвентивных побегов и эмбриогенеза. Этап 3 – перенос микропобегов на среду для укоренения и высадка в грунт.

На основе изучения морфогенетических процессов, происходящих в культуре органов и тканей субтропических и тропических растений Литцем [40] было предложено три пути микроразмножения:

а) активация развития уже существующих в растении меристем (апекс стебля, побега, пазушные и спящие почки стебля);

б) органогенез (индукция и образование адвентивных микропобегов);

в) соматический эмбриогенез.

Некоторые авторы разделяют процессы морфогенеза на методы в зависимости от типа используемого эксплантa и этапов культивирования. Так, Н.В.Катаевой и Р.Г. Бутенко [7] было предложено два различных метода клонального микроразмножения – активация меристем, уже существующих в растении и индукция почек или эмбриоидов *de novo*. Последний они разделили на три самостоятельных: индукция организованных структур непосредственно из специализированных тканей эксплантa; из первичного каллуса; из пересадочной каллусной или суспензионной культуры. При таком разделении исследователи учитывали не только характер процессов морфогенеза, но и четко выявили регенеранты, образовавшиеся из специализированных и каллусных клеток, для которых возможна мутация генома.

В дальнейшем, на основании разработки способов получения регенерантов в культуре органов и тканей В.А.Кунахом [9] выделены два типа клонального микроразмножения. Первый тип, когда растения образуются вследствие активации существующих в интактном растении меристем (апекс побега, пазушные и спящие почки побега), а именно – путем прямого морфогенеза. Автор показал, что такие растения генетически идентичны родительским формам, так как апексы чаще всего генетически стабильны. Второй тип, когда растения образуются в результате формирования почек или эмбриоидов. Растения, полученные из специализированных и каллусных клеток, которым свойственна генетическая изменчивость, часто отличаются от родительских. Этот способ клонального микроразмножения применяется только для тех растений, у которых каллус генетически стабилен и вариабельность между растениями-регенерантами не превышает уровня природной изменчивости. Наряду с этим, предлагаемые исследователями разграничения способов клонального микроразмножения в целом удобны, однако не всегда применимы для отдельных видов и сортов растений.

Органогенез. Формирование адвентивных микропобегов может происходить непосредственно из клеток эксплантa или из образующегося в результате дедифференциации первичного каллуса. В настоящее время имеется ряд сообщений о формировании адвентивных микропобегов у декоративных растений [12, 28, 39, 61].

Цитологические исследования показали, что органогенез начинается с индукции клеточных делений в тканях эксплантa или в образующемся каллусе и с формирования зон повышенной меристематической активности. В дальнейшем в этих зонах происходит заложение апекса побега или корня [2].

При клональном микроразмножении через органогенез многие авторы отдают предпочтение прямому пути. В этом случае индукция адвентивных почек происходит непосредственно из клеток эксплантa. Метод основан на способности изолированных частей растений при благоприятных условиях восстанавливать недостающие органы и таким образом регенерировать новые растения. В его основе заложены два принципиально различных явления 1) возникновение побегов из боковых, интеркалярных меристем, а также из меристемы органов с ограниченным ростом; 2) редифференциация специализированных клеток, образование меристематических очагов и дифференциация стеблевых почек. Различие между этими процессами состоит в том, что меристематическое происхождение растений гарантирует их генетическую идентичность родительским формам [9]. При регенерации микропобегов меристематические ткани, выполняющие определенные функции в растительном организме, реорганизуются, и при этом восстанавливаются их первоначальные функции.

Регенерация почек и корней может происходить из клеток эпидермиса. Многие представители семейства *Gesneriaceae* (сенполия, ахименес, стрептокарпус) регенерируют микропобеги из сегметов листовых пластинок, черешков, стеблей на среде Линсмайер и Скуга, дополненной ИУК и БАП [28].

Формирование многочисленных протокормов гибрида *Vanda* TMA x *Vanda Miss Joaguim* в культуре листовых эксплантов осуществлялось на среде, дополненной 1 мг/л ИУК и 2 мг/л 2ip. Дифференциация происходила на адаксиальной поверхности листьев, тогда как абаксиальная поверхность характеризовалась отсутствием деления клеток [41].

Ряд авторов сообщают о прямой регенерации азалии (*Rododendron simsii*), используя в качестве первичных эксплантов черешки листьев [56]; пеларгонии (*Pelargonium x hortorum* Bailey.) – из листьев проростков [52]; петунии (*Petunia* Juss.) – из высечек листа и сегментов побега [23].

Таким образом, данный метод микроразмножения основывается на возникновении почек из существующих меристем или редифференциации специализированных клеток, с последующей дифференциацией стеблевых почек. В последнем случае адвентивные почки возникают из эпидермиса и субэпидермальных тканей.

Непрямой органогенез включает вторичную дифференциацию адвентивных почек из каллусных тканей. Каллус представляет собой недифференцированную массу делящихся клеток, образующихся на изолированных эксплантах. Каллусные клетки активно делятся и при определенных условиях могут перейти к организованному росту и формированию микропобегов [2].

Так, образование каллуса и адвентивных микропобегов из эксплантов листа и черешка происходило у *Alocasia micholitziana* Sander. сорт Green Velvet [55], из микропобегов и листовых эксплантов гиацинта [34], Основным условием перехода от пролиферации каллуса к органогенезу является соотношение регуляторов роста в питательной среде. При высоком соотношении экзогенных гормонов цитокинин / ауксин происходит образование микропобегов, при низком – индуцируется корнеобразование, а при среднем – происходит пролиферация каллуса. Эта закономерность была впервые установлена Скугом и Миллером [60] в каллусе

сердцевинной паренхимы стебля табака и легла в основу регуляции микроразмножения растений через культуру каллусных клеток.

Оптимальные для образования каллуса концентрации регуляторов роста варьируют в зависимости от вида растения и используемого органа. Нормальные каллусные клетки не способны к синтезу регуляторов роста и поэтому нуждаются в экзогенных регуляторах роста растений.

Каллусные клетки можно длительное время культивировать в условиях *in vitro,* но при этом в них обычно возникают цитогенетические изменения. При длительном пассировании способность каллуса к морфогенезу снижается или вообще исчезает. В то же время возрастает число полиплоидных, анеуплоидных и других генетически аберантных клеток, а следовательно, и вероятность образования из каллуса растений, отличающихся от родительских форм. Так Л.В.Фролова [17] выделяет ряд факторов, ответственных за генетическую изменчивость в культуре клеток: 1) нарушение коррелятивных связей при выделении эксплантa из растения; 2) действие компонентов среды; 3) влияние продуктов метаболизма, накапливающихся в среде; 4) гетерогенность исходного материала и селекция клеток определенного типа.

Для уменьшения риска получения генетического разнообразия можно ограничить период роста каллуса 3-4 пассажами, а также применяя низкие концентрации регуляторов роста в питательной среде.

Однако, несмотря на цитогенетическую изменчивость каллусных клеток, регенерацию из каллуса растений с измененной морфологией, потерю способности каллуса к морфогенезу, пролиферация каллуса с последующей регенерацией из него микропобегов является эффективным, а часто и единственно возможным способом размножения декоративных растений в культуре тканей.

Эффективность клонального микроразмножения в значительной степени определяется правильным выбором питательной среды. Точный состав должен быть подобран в зависимости от потребностей различных групп растений, а некоторые культуры требуют дополнительных веществ для нормального развития.

Основой всех питательных сред являются макро- и микроэлементы, необходимые растению. В состав сред также входят аминокислоты, витамины, регуляторы роста растений. Так как питание культивируемых тканей гетеротрофно, необходимо присутствие углеводов: сахарозы, глюкозы, фруктозы.

При клональном микроразмножении декоративных растений наиболее часто используются среды Мурасиге и Скуга [44], Хеллера [30], Пирика [49], Кнопа [37]. Основные процессы, происходящие при культивировании тканей, в значительной мере регулируются минеральными компонентами питательной среды, их концентрацией и соотношением.

Применение питательной среды Мурасиге и Скуга обусловлено тем, что в ее составе содержится повышенная концентрация неорганического азота за счет присутствия аммонийного и нитратного азота [7]. Это обеспечивает стабильность протекания процессов дифференциации, формообразования и способствует получению регенерантов.

Большинство видов растений эффективней размножаются на агаризованных средах. Однако есть сведения о том, что у некоторых растений морфогенетические процессы более активно протекают на жидких питательных средах. Например, листовые экспланты *Begonia x hiemalis* гораздо активнее регенерируют адвентивные почки и микропобеги на жидкой питательной среде чем на агаризованной [59]. Меристемы гвоздики садовой группы «Сим» культивировали на модифицированной жидкой питательной среде Буюса (1996), дополненной 2,0 мг/л БАП, помещая их на

мостики из стерильной фильтровальной бумаги. Через 3-4 недели культивирования меристемы формировали несколько микропобегов высотой 1-3 см. [10].

Сегменты чешуй гиацинта в условиях *in vitro* формировали луковички на жидкой питательной среде с добавлением цитокинина активнее, чем на агаризованной. В процессе культивирования ткань чешуй интенсивно разрасталась, формируя все новые луковички [15].

Вместе с тем микропобеги хризантемы, полученные на агаризованной среде намного успешнее укоренялись на жидкой питательной среде МС, в которой концентрация ИУК составляла 0,1 мг/л [54].

Жидкие питательные среды имеют определенные преимущества перед агаризованными: 1) подвижность питательных веществ; 2) частичная или полная замена в ходе культивирования; 3) не наблюдается ярко выраженного апикального доминирования микропобегов, что связано с хорошим снабжением растений питательными веществами, обеспечивающими развитие всех почек.

На начальных этапах культивирования эксплантов крайне важно успешное прохождение процессов дедифференциации и вступление клеток в эмбриональное состояние; начало активного клеточного деления, образование каллуса и органогенез. На этом этапе должны быть созданы оптимальные условия питания. Для этого в состав питательной среды помимо минеральных элементов и солей, углеводов вводят такие составляющие как аминокислоты, витамины, ауксины, цитокинины, гиббереллины, растительные экстракты и другие вещества. На этапах размножения, когда происходит рост образовавшегося микропобега и развитие корня, состав питательной среды упрощается, в качестве регуляторов роста чаще всего используют только ауксин.

При введении экспланта на питательную среду ее дополняют антиоксидантами для подавления активности ряда ферментов и предотвращения гибели эксплантов, а также добавляют активированный уголь. Адсорбирующие свойства угля способствуют равномерному распределению питательных элементов в среде и удалению продуктов метаболизма развивающихся тканей. Кроме того, добавление активированного угля обеспечивает затемнение среды для нормального развития корней.

В состав многих питательных сред включают витамины, которые продлевают срок жизни эксплантов, нормализуют некоторые ростовые процессы, протекающие при регенерации, но не являются фактором, определяющим развитие экспланта

Для большинства растений оптимальным источником углеводов является сахароза или глюкоза в концентрации 20-40 г/л. Для индукции каллусообразования и индукции морфогенеза на первом этапе размножения используют 20-30 г/л сахарозы или глюкозы. Иногда их используют в комплексе. Так, быстрое увеличение ростового индекса у цимбидиума сорта Melita было достигнуто при одновременном применении сахарозы и глюкозы в концентрациях 4,5 г/л, и 25, 5 г/л соответственно [14].

Важным фактором, регулирующим процессы морфогенеза, является наличие в питательной среде регуляторов роста – ауксинов, цитокининов, гиббереллинов. Подбирая соотношение и концентрации этих веществ, можно направленно регулировать их органогенное действие. Для каждого вида, а иногда и сорта растения, должны быть установлены оптимальные концентрации регуляторов роста в питательной среде.

К группе цитокининов относятся кинетин, БАП, зеатин, 2ip и другие. Местом синтеза цитокининов в растении являются корни, откуда они транспортируются вверх по стеблю с транспирационным соком.

Цитокинины играют важнейшую роль в процессе дедифференциации клеток эксплантов, приводящей к делению и образованию каллуса. Они снимают апикальное доминирование и индуцируют развитие пазушных почек, стимулируют рост

покоящихся органов. Также цитокинины необходимы для дифференциации стеблевых почек в культуре каллусных тканей и при регенерации побегов из клеток эксплантов.

К группе ауксинов принадлежат ИУК, ИМК, НУК, 2,4-Д. Основное место синтеза ауксинов – апикальная меристема стебля. Ауксины также могут синтезироваться в активно растущих меристемах корня, в развивающихся зародышах и семяпочках, листьях и семядолях; они перемещаются по растению аполярно. Ауксины оказывают влияние на растяжение клеток, их деление и дифференцировку. Они активизируют образование корневых зачатков у основания побега, луковичек *in vitro,* регенерацию побега из каллуса экспланта [7]. Большинство декоративных растений выращивают в условиях *in vitro*, культивируя их на питательных средах, содержащих ауксины и цитокинины.

Совместное внесение в питательную среду веществ разных групп действует синергически или антагонистически. Например, кинетин усиливает каллусогенное действие ауксинов, но снижает их корнеобразующее влияние. Ауксины в низких концентрациях повышают действие цитокининов, которое направлено на образование адвентивных почек, а цитокинины в низких концентрациях усиливают корнеобразующее действие ауксинов [46].

На питательной среде МС, дополненной 0,5 μМ кинетина и 0,5 μМ 2,4-Д получена регенерация микропобегов из каллуса черешка *Alocasia micholitziana* сорт Green Velvet [61]. Полученные микропобеги успешно укоренялись на безгормональной питательной среде.

Активное побегообразование рододендрона сорта Monteg было получено на среде для древесных растений, дополненной 10-50 μМ 2ip [22]. Количество микропобегов увеличивалось при каждом пассаже на свежую питательную среду. Массовая регенерация микропобегов петунии (*Petunia* Juss.) была осуществлена на среде МС с введением 2,2 μМ БАП и 5,7 μМ ИУК в течение 4-х недельного субкультивирования [57].

S.Kintzios и коллеги [36], используя питательную среду МС с добавлением 5,2 μМ БАП м 5,7 μМ НУК, получили полноценные проростки *Rosa* L. из соматических зародышей, имеющих листовое происхождение. Регенеранты розы успешно адаптированы *in vivo*.

При низких концентрациях TDZ (2,5 μМ) на эксплантах листа и черешка эксплантов сенполии сорта Benjamin наблюдали процесс органогенеза, тогда как высокие дозы TDZ (5-10 μМ) индуцировали соматический эмбриогенез [46].

Разработан эффективный способ размножения *Rosa damascena* Mill. на среде МС, применяя в качестве цитокинина 1,0-2,5 μМ TDZ [38].

Одной из важнейших проблем при клональном микроразмножении растений является вопрос о концентрации вносимых регуляторов роста. В последнее время появилось много данных о том, что высокие концентрации регуляторов роста оказывают негативное действие на морфогенетические особенности получаемых растений, а также на возможность длительного микроразмножения в условиях *in vitro*.

Возможно в процессе культивирования побегов происходит постепенное накопление регуляторов роста в культивируемых тканях выше необходимого физиологического уровня и при этом они оказывают токсическое действие. Это приводит к изменению морфологии растений, подавлению пролиферации пазушных меристем, уменьшению способности побегов к укоренению. Использование среды с минимальной концентрацией цитокининов, которая обеспечивает высокую скорость микроразмножения, уменьшает их негативное воздействие. Чередование циклов культивирования на средах с высоким и низким уровнем регуляторов роста также помогает избежать токсического действия цитокининов.

Кроме ауксинов и цитокининов на регуляцию процессов морфогенеза *in vitro* оказывают влияние гиббереллoвая кислота (ГК), абсцизовая кислота и другие вещества.

Экзогенные гиббереллины усиливают рост и вытягивание стебля, листьев, индуцируют прорастание семян, снимают состояние покоя. ГК вносят в питательную среду с целью ускорения роста сформировавшихся почек и получения растений с хорошо развитой надземной частью.

Вегетативные почки *Paeonia suffruticosa* Andr. сорт Ялтинская Весна регенерировали дополнительные микропобеги на среде МС + 3,55-6,60 мкМ БАП + 2,03-5,77 мкМ ГК. Сочетание ГК с цитокинином в определенных пропорциях увеличивало коэффициент размножения. Количество микропобегов / эксплант составило 3-4 шт. [5].

Наличие абсцизовой кислоты и ГК в питательной среде, по мнению исследователей [47], способствует прорастанию соматических зародышей и получению полноценных проростков розы (*R. hybrida* L.).

Концентрация ионов водорода влияет на устойчивость и усвоение ряда компонентов в питательной среде. Наиболее чувствительны к pH ИУК, гиббереллoвая кислота, витамины. От величины pH зависит доступность для тканей фосфатов, соединений железа, солей тяжелых металлов.

Оптимальными для большинства изолированных тканей являются среды с pH 5,0-5,8 [18]. Для поддержания постоянного значения pH необходимо вводить в среду буферные смеси и хеллат железа.

Среди условий культивирования освещение и температура в значительной степени влияют на регенерацию в культуре *in vitro*. Оптимальное освещение – необходимый фактор для морфогенеза и образования хлорофилла. Т.Мурасиге [45] установил, что для регенерации микропобегов герберы, а также большинства травянистых растений, которые принадлежат к различным родам, стандартная интенсивность освещения составляет 1000 – 5000 люкс. Низкая освещенность (до 300 люкс), также как и высокая (от 3000 до 10000 люкс), сильно подавляет процессы морфогенеза.

Многие исследователи считают, что интенсивность освещения имеет большое значение для индукции органогенеза **[**11, 15, 18**].** Снижение интенсивности освещения до 1-1,5 клк стимулировало адвентивное побегообразование у листовых дисков иссопа [16].

Для некоторых видов декоративных растений на начальных этапах культивирования эксплантов отсутствие освещения стимулирует процесс адвентивного побегообразования [21, 63].

Каллусные ткани обычно выращивают в темноте, так как культура клеток на среде, содержащей сахарозу, не нуждается в фотосинтезе. Соматический эмбриогенез в культуре каллуса происходит после перенесения на свет [29]. Для укорененных побегов перед адаптацией можно увеличивать освещенность до 10 клк, так как это часто способствует лучшей адаптации регенерантов [3].

Так, культивирование эксплантов гиацинта в течение 2-х недель в темноте на этапе введения в условия *in vitro* способствовало дальнейшему массовому побегообразованию [50].

Проведение 2-3-х недельного культивирования чешуй *Iris x hollandica* в темноте способствовало повышению частоты регенерации [27].

Сегменты внутренних чешуй луковицы *Lycoris aurea* (*Amaryllidaceae*) культивировали на питательной среде МС, содержащей 3% сахарозы, 1 г/л гидролизата казеина, 100 мг/л мезоинозита, 80 мг/ аденинсульфата, 1 мг/л тиамина, 0,5 мг/л пиридоксина, 5 мг/л никотиновой кислоты и 2 мг/л глицина, 30 мг/л НУК и 30 мг/л БАП. Первые 3 месяца экспланты культивировали в темноте. Затем набухшие

экспланты пассировали на среду МС, дополненную 3 мг/л НУК и 10 мг/л БАП и выставляли на свет. Через 1 месяц культивирования образовывались микропобеги *Lycoris aurea,* которые укоренялись на среде МС, содержащей 3 мг/л НУК [33].

А.Высоцкий [4] показал, что 16-часовой фотопериод имеет благоприятное воздействие на развитии растений в сравнении с культивированием при освещении на протяжении суток. Изучая влияние светового периода на морфогенез растений *in vitro* T.Murashige [45] установил, что 16-часовой период освещения является оптимальным для многих видов растений. Допустимы суточные колебания, обусловленные дополнительным нагревом пространства за счет энергии ламп. Продолжительность фотопериода зависит от вида интактного растения. Из литературных сообщений известно, что большинство исследователей выращивали свои культуры при 16-часовом фотопериоде [2, 29]. В каллусе пеларгонии максимальное количество адвентивных почек образовывалось при 16-часовом фотопериоде, увеличение или уменьшение продолжительности освещения угнетало процессы морфогенеза [24]. Известно, что многие виды орхидных чувствительны к изменениям фотопериода. При чередовании циклов продолжительности светового дня удалось получить в условиях *in vitro* соцветия у представителей *Doriella* [25].

Температура также оказывает большое влияние на рост и регенерацию изолированных органов и тканей растений. Для большинства культур оптимальный уровень температур находится в пределах 23-25ºС. Однако при клональном микроразмножении следует принимать во внимание температурный показатель, требуемый для данного вида растений, культивируемых в условиях *in situ* и *ex situ*. Часто стратификация эксплантов луковичных культур путем охлаждения, предшествующая культивированию ткани, улучшает ее регенерационную способность [15].

Каллус *Begonia venosa* Skan., который удалось индуцировать из эксплатов соцветий на питательной среде, дополненной 0,5 мг/л БАП и 0,5 мг/л НУК [51], культивировали при температуре 21ºС. Снижение температуры до 17°С замедляло индукцию и рост каллуса, тогда как повышение до 25ºС вызывало его некроз.

Для органогенеза луковичных культур необходима температура ниже оптимальной (23-25ºС). Экспланты из чешуй луковиц гиацинта, культивируемые при температуре 15-20ºС, формировали многочисленные микропобеги *in vitro,* тогда как экспланты, культивируемые при 25ºС формировали единичные побеги [50].

Чешуи и меристематическая ткань лилии и гиппеаструма были способны образовывать каллус и луковички. Их количество и размер увеличивались при температуре 25-28ºС, в то время как у чешуй гиацинта – при 15ºС. Размер деток-луковичек увеличивался более интенсивно при 23-26ºС [65].

При выращивании теплолюбивых тропических растений температура культивирования может повышаться до 25-30ºС. Так, при микроразмножении *Monstera deliciosa* Liebm. var *borsigiana* (C.Koch.) Engl. температура 30ºС была более благоприятной, чем 20-25ºС [26].

Характеристика исходных растений

Важным фактором при разработке способов клонального микроразмножения является характеристика исходных растений.

Бегония. Род бегония (*Begonia* L.) относится к одноименному семейству бегониевых (*Begoniaceae* C.A.Agardh.). В роде насчитывается около 1000 видов и разновидностей. Естественный ареал – тропические влажные леса, горы, а также субтропические и тропические районы Африки, Азии и Америки. Бегонии обладают большим разнообразием форм окрасок листьев и цветков, а также обильным и продолжительным цветением. Цветки бегонии собраны в кистевидные пазушные соцветия, образующиеся на верхушках побегов. Окраска цветков весьма разнообразна:

от огненно-красных, снежно-белых, розовых разных оттенков, до зеленоватых, желтых и оранжевых (рис. 1). Большинство бегоний успешно растут при комнатной температуре. В цветоводстве в настоящее время получили распространение около 130 видов и около 2000 гибридов [20]. Исходя из биологических особенностей и использования, формы и сорта бегонии делят на две группы: красивоцветущие и декоративно лиственные. Основные представители красивоцветущих бегоний – бегония всегдацветущая, бегония клубневая и бегония элатиор.

Рис. 1 Цветущее растение *B. riger elatior* сорта Nixi rose
Fig. 1 Flowering plant of *B. riger elatior*, cv. Nixi rose

Бегония элатиор (*Begonia* x *elatior*, B. *hiemalis*) – гибридная форма, которая получена в результате скрещивания *B. tuberhybrida* и *B. socotrana* и отличается особой декоративностью. В Германии были получены крупноцветковые мелколистные сорта, получившие название в честь своего создателя – раса элатиор-Ригера или *Begonia riger elatior*. Растения компактные, хорошо облиственные. Цветоносы многоярусные. Цветки простые или махровые, чаще оранжево-красных тонов. На хорошо сформированном растении их может быть до 80 штук.

Основной способ размножения – укоренение черенков, используя для этого побеги, листья и даже фрагменты листа.

В опытах использовали растения *B. riger elatior* сортов Krefeld, Schwabenland, Nixi red и Nixi rose, Lorrenie:

сорт Krefeld - растение высотой 25-30 см, компактной формы. Листья блестящие, некрупные, длиной около 8 см. Цветки 3-5 см в диаметре, полумахровые, красной гаммы;

сорт Schwabenland – растение высотой 25-35 см, компактной формы. Листья сочные, округлые, длиной около 7-9 см. Цветки полумахровые, красной гаммы;

сорта Nixi red и Nixi rose – растения высотой 25-30 см, компактной формы. Листья блестящие, округлые, длиной до 8 см. Цветки махровые, красные и розовые;

сорт Lorrenie – растение высотой до 30 см, компактной формы. Листья округлые, светло-зеленые, длиной до 9 см. Ампельный сорт. Цветоносы – плети до 25-30 см. Цветки полумахровые, крупные, сиренево-розовые.

Каладиум. Род каладиум (*Caladium* Vent.) относится к семейству *Araceae* J.Bogner&J.French. Родина – тропические районы Бразилии. *Caladium hortulanum* Birdsey. – травянистое растение с крупными (10-12 см в диаметре) шишковидными клубнями. Листья стреловидной и копьевидной формы, разнообразны по окраске и расположены на сильных голых черенках (рис. 2). Листья иногда достигают крупных размеров – до 30 см в

длину и 15-17 см в ширину. *C. hortulanum* цветет в культуре очень редко и его мелкие цветки образуют початок [19]. Основным достоинством этого декоративного растения является наличие необычайно разнообразных по окраске листьев. Существует около 15 видов. Гибриды тропического *C. hortulanum* развиваются с весны до начала осени. Зимой у них наступает период покоя. Размножается растение детками или делением клубня с очень низким коэффициентом вегетативного размножения. В опытах использовали *C. hortulanum* сортов, представленных в коллекции НБС-ННЦ:

Рис. 2 Растения *C. hortulanum* сортов Frieda Hemple, Candidum и Gipsy Rose
Fig. 2 *C. hortulanum* plants, cvs. Frieda Hemple, Candidum, Gipsy Rose

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 продолжается с апреля по октябрь;

сорт Frieda Hemple – среднерослый, черешок листа светло-коричневый, полосатый, лист ярко-зеленый с малиново-красным пятном по центру. Растение образует в среднем 5-6 листьев размером до 18-20 см в длину и 9-12 см в ширину. Период вегетации – с апреля по октябрь;

сорт Candidum – сильнорослый, черешок листа коричневый, полосатый, лист белый с зелеными прожилками. Растение образует 5-7 листьев размером 25-30 см в длину и 15-20 см в ширину. Период вегетации – с апреля по октябрь;

сорт Gipsy Rose – среднерослый, черешок листа темно-коричневый со светлыми штрихами, лист темно-зеленый с белыми и розовыми пятнами.

Растение образует в среднем 5-6 листьев размером до 18-20 см в длину и 9-13 см в ширину. Период вегетации – с апреля по октябрь.

Сенполия. Род сенполия (*Saintpaulia* Wendl.) является представителем семейства *Gesneriaceae* Dum. Род включает 20 видов. Сенполия (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) также известна как африканская фиалка или узамбарская фиалка. Родина – Восточная Африка, Танзания и Кения [8].

S. ionantha представляет собой небольшое травянистоем растение (рис. 3). Листья имеют округлую или эллиптическую форму, на длинных черешках, собраны в горизонтальную прикорневую розетку. Цветки не крупные, от 3 до 7 на одном цветоносе. Цветение продолжается до 8 месяцев. В настоящее время насчитывается 1200 сортов

растений, особенно декоративны гибридные формы. Существуют растения *S. ionantha,* характерные сортовые признаки которых позволяют выделить их в самостоятельные группы. Это миниатюрные и полуминиатюрные, свисающие и пестролистные. В отличие от обычных *S. ionantha* у пестролистных в окраске листьев помимо зеленого цвета присутствуют и другие цвета (белый, розовый, кремовый, лимонный). Пестрая окраска листьев – результат естественных мутаций, которые приводят к снижению количества хлорофилла, недостаток которого меняет окраску листа и обуславливает пестролистность.

Рис. 3 Растение *S. ionantha* сорта Ruffled Skyes
Fig. 3 Plant *S. ionantha,* cv. Ruffled Skyes

Гибридные *S. ionantha* при семенном размножении обычно гетерогенны и не повторяют свои сортовые признаки. Поэтому в целях сохранения положительных качеств сорта обычно их размножают вегетативно с использованием листовых черенков. Однако вегетативное размножение пестролистных *S. ionantha* имеет свои особенности. В этом случае используют максимально зеленые листья с тем, чтобы обеспечить питание дочерним побегам, так как их первые развивающиеся листья полностью лишены хлорофилла. Зацветают гибридные растения обычно через 8-20 месяцев.

В исследования были включены гибриды пестролистных форм *S. ionantha*:

сорт Apachi Midnight – растение компактное, листья округлые, зелено-бело-розовые. Цветки темно-синие с гофрированным краем;

сорт Margery's Melody – растение компактное, листья крупные, ярко расписанные. Цветки ярко-малиновые, махровые с гофрированным краем;

сорт Ness Orange Pekoe – растение крупное, листья слегка волнистые, оторочены белым. Цветки лососевые, махровые.

Зеленолистные формы *S. ionantha* :

сорт Alocha Orchid – растение-гигант, листья мощные, черно-зеленые, блестящие. Цветы ярко-розовые, крупные с оборкой;

сорт Ruffled Skyes – растение компактное, листья некрупные, стеганные. Цветки голубые, густомахровые. Обильное цветение;

сорт Ruffles Snow Rose – растение компактное, листья округлые, гладкие, темно-зеленые. Цветки малиновые с белой окантовкой, махровые.

Выращивание исходных растений-доноров в теплице с соблюдением определенных правил агротехники облегчает процесс стерилизации и снижает в дальнейшем уровень контаминации растительного материала.

Особенности введения эксплантов декоративных растений в культуру in vitro

Первым этапом введения первичных эксплантов в культуру *in vitro* является подбор стерилизующих агентов и способов стерилизации. Для разработки способа стерилизации эксплантов *B. riger elatior, S. ionantha* и *C. hortulanum* последовательность этапов данного процесса и вещества необходимо было разрабатывать экспериментально.

Подбирая реагенты и разрабатывая технику стерилизации, учитывают эффективность препаратов и их фитотоксичность. Для стерилизации используют 70%-ный этанол (C_2H_5OH), 1-2%-ный раствор гипохлорита натрия (NaClO), 0,08%-ный раствор нитрата серебра ($AgNO_3$), 1%-ный раствор Thimerosal и их комбинации. Эффективность стерилизации повышают за счет добавления к стерилизующему агенту детергента Твин-80. Процесс стерилизации растительного материала условно можно разделить на несколько этапов. На первом этапе отобранные части интактных растений очищают механически. Затем растительный материал тщательно промывают под проточной водой (2-3 раза) и в слабом мыльном растворе, снова прополаскивая водой. После этого части растений разрезают на сегменты такого размера, чтобы они могли помещаться в сосуды со стерилизующими растворами.

Получение стерильной культуры сортов и гибридов *B. riger elatior*. Для стерилизации органов и тканей *B. riger elatior* проводят испытание реагентов и их комбинаций при разных экспозициях. Сегменты соцветий *B. riger elatior* и листья стерилизовуют, погружая последовательно в 70%-ный C_2H_5OH на 1 мин, в 1-1,5%-ный раствор NaClO и трижды промывают стерильной дистиллированной водой. Более эффективной оказалась стерилизация в 1%-ном растворе гипохлорита натрия с экспозицией 10 минут. Такой способ является наиболее эффективным, так как удалось достичь не только низкого уровня контаминации эксплантов *B. riger elatior* (20%), но и получить достаточно высокую частоту регенерации микророзеток (80%). Большинство стерильных эксплантов проявляют способность к морфогенезу и активной регенерации растений.

Другим, не менее эффективным стерилизующим агентом в наших исследованиях, оказался раствор нитрата серебра. Использование в качестве стерилизующего агента 0,08%-ного раствора $AgNO_3$ в течение 6-8 мин снижает уровень контаминации грибной инфекцией с 42% до 25%. Как показали наблюдения, этот реагент обладает фитонцидным действием, что в дальнейшем снижает (до 15%) регенерационную способность вводимых в условия *in vitro* эксплантов.

Стерильные первичные экспланты листа размером 1 х 1 см и сегменты соцветий длиной 12 мм помещают на питательные среды МС и А.

Получение стерильной культуры *S. ionantha*. Учитывая морфобиологические особенности (опушение листа), листья *S. ionantha* последовательно помещают в 1%-ный раствор Thimerosal с экспозицией 25 мин, затем в 70%-ный C_2H_5OH – 1 мин и в 0,08%-ный раствор $AgNO_3$ – 3-5 мин. После стерилизации растительный материал трижды прополаскивают в стерильной дистиллированной воде. В результате применения ступенчатой стерилизации снижение уровня контаминации составляло от 12% до 6%. При таком способе стерилизации ткани листа на модифицированной среде S 1 оставались зелеными и в дальнейшем проявляли высокую способность к морфогенезу и регенерации (75-94%). Дальнейшее увеличение экспозиции стерилизации в 0,08%-ном растворе $AgNO_3$ до 6-8 мин способствует 100%-ному выходу эксплантов, свободных от контаминации. Однако при таком воздействии реагента отмечено сильное фитотоксическое действие на растительную ткань, что в свою очередь влияет на снижение регенерационного потенциала до 12%.

Применение 70%-ного C_2H_5OH и 1%-ного раствора NaClO в течение 5-10 мин оказалось менее эффективным. Уровень контаминации в этом случае составлял 64-

72%. У таких эксплантов процесс морфогенеза начинался значительно позже. После стерилизации лист первоначально разрезают пополам вдоль центральной жилки, а затем делят на сегменты размером 1 х 1 см, которые помещают на поверхность модифицированной питательной среды S 1.

Получение стерильной культуры сортов *C. hortulanum*. Исходный растительный материал *C. hortulanum* (лист) стерилизуют в 1,8%-ном растворе гипохлорита натрия в течение 5 мин, затем погружают в 70%-ный этанол. Уровень контаминации составлял 4-5%. Все свободные от инфекции экспланты обладали высоким морфогенетическим потенциалом. Однако увеличение продолжительности обработки тканей до 10 мин хотя и приводит к 100%-ной стерильности эксплантов, тем не менее, как и в случае с *S. ionantha,* только 15-20% таких эксплантов регенерируют микропобеги, а на отдельных из них появляются некротические участки ткани.

Применение реагентов – 0,08%-ного раствора $AgNO_3$, 1%-ного раствора Thimerosal также увеличивает выход стерильных эксплантов. Однако их последовательное применение оказывает заметное негативное влияние на растительные ткани, что в дальнейшем вызывает снижение морфогенетического потенциала и регенерации растений.

Высечки листа *C. hortulanum* исследуемых сортов размером 1 х 1 см из разных зон листовой пластинки помещают на модифицированную питательную среду Cl 1 с добавлением регуляторов роста в различных концентрациях и сочетаниях.

Известно, что лист является самодифференцирующимся органом с многочисленными клетками, обладающими меристематической активностью. Особенно активны меристемы влагалища и дистальной части листа. Листовые экспланты у большинства видов растений в условиях *in vitro* способны к образованию каллуса и дифференциации адвентивных почек, побегов и корней [7].

Многие декоративные растения размножаются с помощью сегментов листовых пластинок и черешков листа [18]. Известно, что ткани, окружающие проводящие пучки в листовых пластинках, имеют повышенные органогенные свойства. Как правило, из них образуется морфогенный каллус, в котором происходят различные процессы морфогенеза, а получаемые таким образом регенеранты способны адаптироваться в условиях *in vivo*. При использовании листа для клонального микроразмножения растений следует иметь в виду, что на морфогенез могут существенно влиять генотип, возраст листа и ориентация листового эксплантa на поверхности питательной среды, размер исходного эксплантa. Растения, полученные через этап каллусообразования, фенотипически могут существенно отличаться от исходных. Однако в ряде случаев непрямой органогенез является единственно возможным способом клонального микроразмножения многих растений. Для поддержания генетической стабильности полученных растений целесообразно использовать прямой путь регенерации, непосредственно из клеток эксплантa. В этом случае на одном листовом эксплантe одновременно происходит формирование адвентивных почек и микропобегов.

Способ регенерации растений в культуре органов и тканей B. riger elatior

О возможности клонального микроразмножения *Begonia x elatior* с использованием таких эксплантов, как верхушки побегов, сегменты цветоножки, ткани цветоноса и цветков, сегменты чашелистиков, лепестков, черешков, стеблевых отрезков описано в ряде публикаций [42, 54]. Тем не менее эти исследования проводились на отдельных сортах и группах гибридных бегоний, у которых не возникало особых проблем с получением микророзеток. Для промышленного размножения большой интерес представляет *B. riger elatior*. Однако отсутствие универсальной питательной среды, обеспечивающей микроразмножение и получение регенерантов разных сортов, создавало определенные трудности при разработке способов размножения данной культуры в условиях *in vitro*. В

связи с этим в процессе исследований нами была поставлена цель – изучить роль генетических, онтогенетических и физиологических факторов в развитии эксплантов разных сортов на одной и той же питательной среде. Разрабатывая состав питательной среды, пригодной для культивирования сортов *B. riger elatior,* необходимо было прежде всего исследовать морфогенетические потенции эксплантов и их зависимость от влияния регуляторов роста.

Так, регенерацию микророзеток индуцируют из высечек листа и сегментов соцветия на питательных средах МС, А и Б, модифицированных нами. В состав питательных сред вводят различные регуляторы роста растений в определенных концентрациях, сочетаниях и соотношениях.

Для *B. riger elatior* сортов Krefeld и Schwabenland получена прямая регенерация микророзеток в культуре изолированных листовых эксплантов (рис. 4). При этом установлено, что важную роль в стимулировании прямой регенерации микророзеток имели различные соотношения БАП и ИУК. В этом эксперименте высечки листа размером 1 х 1 см помещали на агаризованную питательную среду абаксиально и адаксиально. Концентрация цитокинина оказывала существенное влияние на число микророзеток и их дальнейшее развитие.

В ходе эксперимента было отмечено, что лучшей питательной средой оказалась среда МС в нашей модификации, содержащая 2,22-17,80 мкМ БАП и 4,57-5,71 мкМ ИУК, на которой активно формировались адвентивные почки и микророзетки. В этом случае прослеживается четкая корреляционная зависимость между концентрацией цитокинина и ауксина в питательной среде и числом регенерировавших микророзеток. При наличии в составе питательной среды только БАП в концентрации 2,22-17,80 мкМ формируется каллус. Однако этот каллус в дальнейшем не проходит этапа дифференциации, что не позволяет получить микророзетки. При наличии в составе питательной среды только 4,57-5,71 мкМ ИУК отмечено образование каллуса и корней. Одновременное сочетание в среде БАП и ИУК способствует получению максимального количества микророзеток у сортов Krefeld и Schwabenland (рис. 5).

Рис. 4 Прямая регенерация микропобегов из листовых эксплантов *B. riger elatior* сорта Krefeld
Fig. 4 Microshoots direct regeneration from leaf explants of *B. riger elatior* cv. Krefeld

Рис. 5 Массовое образование микророзеток у сорта Schwabenland на среде с 8,90-11,20 мкМ БАП и 5,71 мкМ ИУК
Fig. 5 Mass formation of microrosettes for cv. Schwabenland on medium with 8,90-11,20 µM BAP and 5,71 µM IAA

Данные, представленные на рисунке 6, подтверждают, что 8,90-11,20 мкМ БАП в сочетании с 5,71 мкМ ИУК были оптимальными концентрациями для адвентивного побегообразования. В присутствии 6,22 мкМ БАП и 5,71 мкМ ИУК, а также 13,30 мкМ БАП и 5,71 мкМ ИУК количество листовых эксплантов, которые образовывали микророзетки достигало 56% и 88% соответственно. Дальнейшее увеличение концентрации регуляторов роста приводило к образованию двух типов каллуса (компактного и рыхлого), что значительно снижало частоту регенерации микророзеток. Регенерация микророзеток в условиях *in vitro* происходила без образования каллуса, что обеспечивало их генетическую стабильность.

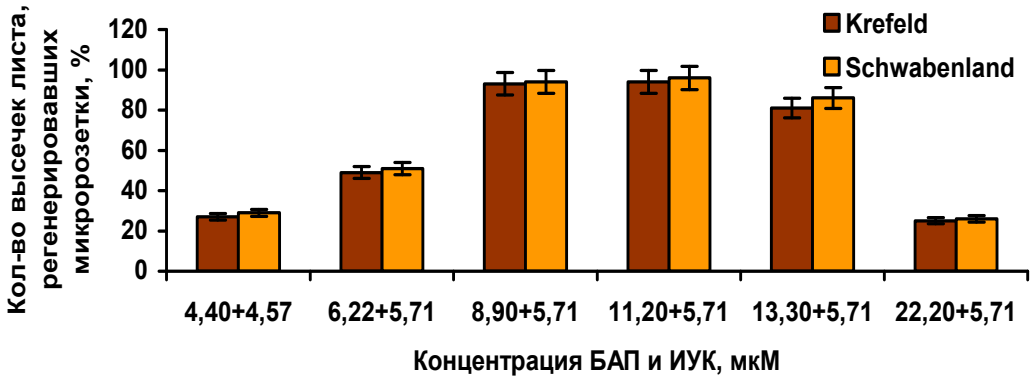


Рис. 6 Влияние концентрации БАП и ИУК на регенерацию микророзеток сортов Krefeld и Schwabenland
Fig. 6 Influence of BAP and IAA concentrations on the regeneration of microrosettes in cvs. Krefeld and Schwabenland

В ходе выполнения экспериментов установлено, что положение листовых эксплантов на питательной среде оказывает значительное влияние на частоту регенерации микророзеток *B. riger elatior* сортов Krefeld и Schwabenland. Так, максимальный выход микророзеток получен при адаксиальном расположении листовых эксплантов *B. Riger elatior* двух исследуемых сортов на поверхности питательной среды по сравнению с абаксиальным. Количество листовых эксплантов, способных к регенерации при адаксиальном расположении через 8 недель культивирования достигало 95-98% в зависимости от сорта *B. riger elatior*.

Наряду с этим, в ходе экспериментов нам не удалось индуцировать прямую регенерацию микророзеток в культуре изолированных листовых эксплантов у сортов Nixi red, Nixi rose и Lorrenie. Поэтому дополнительно в исследования в качестве первичных эксплантов были включены сегменты соцветий растений пяти сортов *B. Riger elatior*. Морфогенетический потенциал первичных эксплантов реализовался через непрямой органогенез.

В таблице 1 представлены составы питательных сред для разных этапов морфогенеза *B. Riger elatior* сортов Krefeld, Schwabenland, Nixi red, Nixi rose и Lorrenie. Стерильные экспланты соцветий исследуемых сортов помещают на агаризованную питательную среду А, в состав которой были включены макроэлементы по прописи Кнопа, микроэлементы по Буржен-Ничу и дополненную регуляторами роста, сахарозой, аденин сульфатом. Экспланты, культивируемые при температуре 23-25ºС, интенсивности освещения 2-3 клк, 16-часовом фотопериоде и относительной влажности воздуха 70%, спустя 4-5 недель активно формируют морфогенный каллус. Следует отметить, что максимальную индукцию каллуса наблюдали в пазухах прицветников и базальных частях цветоножки, особенно у молодых соцветий.

Таблица1

Составы питательных сред для различных этапов морфогенеза в культуре сегментов соцветий *B. riger elatior*

Table 1

Composition of culture media for different morphogenesis stages in segments culture of inflorescence in *B. riger elatior*

Компоненты	Среда А индукция каллусообразования	Среда Б регенерация микропобегов	Среда С ризогенез
Макросоли, мг/л			
KNO_3	125	125	125
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	500	500	500
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	125	125	125
KH_2PO_4	125	125	125
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8	27,8	27,8
Na_2ЭДТА$\cdot 2H_2O$	37,3	37,3	37,3
Микросоли, мг/л:			
H_3BO_3	10	10	10
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	25	25	25
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025	0,025	0,025
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025	0,025	0,025
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	10	10	10
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25	0,25	0,25
Витамины, мкМ:			
Глицин	8,61	8,61	8,61
Тиамин-HCl	1,49	1,49	1,49
Пиридоксин-HCl	2,96	2,96	2,96
Никотиновая к-та	40,6	4,06	4,06
Мезоинозит	555,1	555,1	555,1
Регуляторы роста, мкМ:			
БАП	13,30	4,40	-
НУК	2,69	2,69	-
ИУК		1,14	
ИМК	-	-	4,90
ГК		2,89	
Аденин$\cdot SO_4$	54,29	54,29	-
Фолиевая к-та	1,13	1,13	-
Биотин	0,20	0,20	-
Сахароза, г/л	30,0	20,0	30,0
Агар, г/л	8,0	8,0	8,0

В процессе исследований установлено влияние регуляторов роста на индукцию каллусогенеза *B. Riger elatior* исследуемых сортов. Так, на этапе индукции каллусообразования у эксплантов изучаемых сортов, БАП на фоне постоянной концентрации НУК (2,69 мкМ) оказался эффективным цитокинином (рис. 7).

Проведенные исследования показали, что каллус образовывался из сегментов соцветий во всех вариантах опытов. Однако биометрические показатели нарастания каллуса значительно варьировали в зависимости от содержания регуляторов роста в питательной среде. Максимальная частота каллусогенеза была отмечена на агаризованной питательной среде А, дополненной 2,69 мкМ НУК и 13,30 мкМ БАП. На питательных средах, содержащих НУК при культивировании на свету начало каллусогенеза отмечали через 15-20 суток. Образовавшийся каллус имел желто-зеленую окраску, клетки каллуса были крупные (рис. 8). В опыте на питательной среде содержащей 2,4-Д, каллус имел плотную консистенцию, ярко-зеленый цвет. Частота индукции каллусогенеза варьировала в пределах от 0 до 20%.

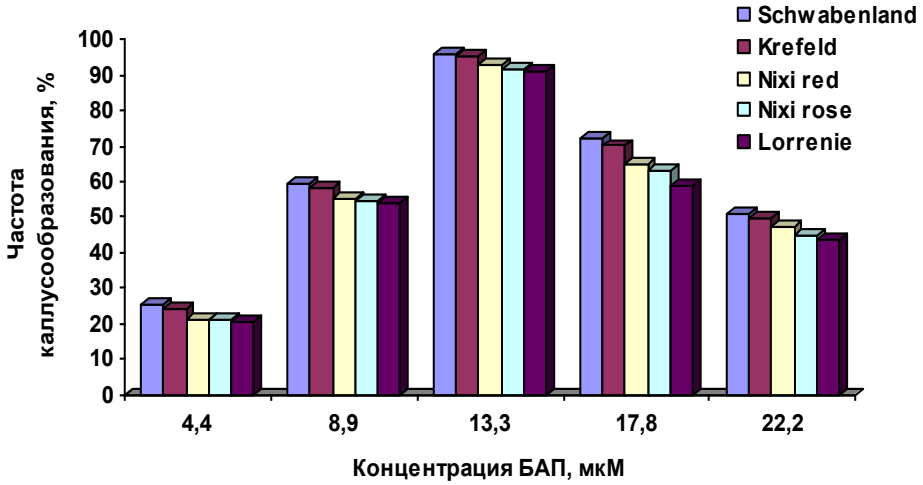


Рис. 7 Влияние БАП на индукцию каллусогенеза в культуре сегментов соцветия *B. riger elatior* в условиях *in vitro* (2,69 мкМ НУК)
Fig. 7 Influence of BAP on induction of callusogenesis in segment culture of infloriscence in *B. riger elatior* *in vitro* (2,69 µM NAA)

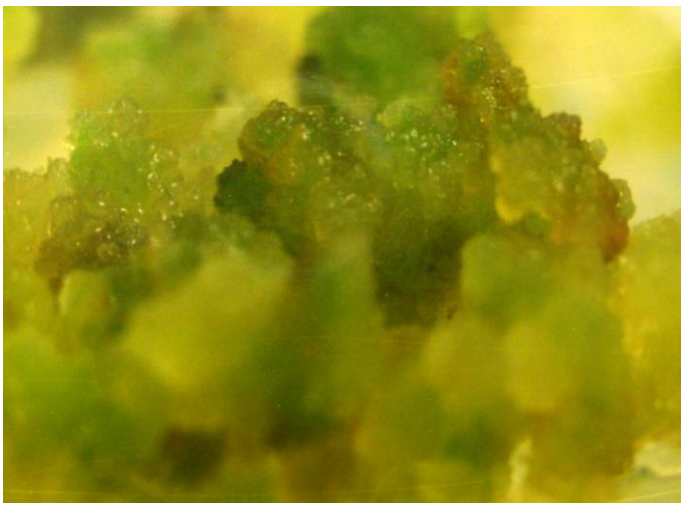


Рис. 8 Формирование морфогенного каллуса на свету в культуре сегментов соцветия *B. riger elatior* сорт Nixi red на среде А, дополненной 2,69 мкМ НУК и 13,30 мкМ БАП
Fig. 8 Formation of morphogenic callus under light in segment culture of inflorescence of *B. riger elatior* cv. Nixi red on medium A with 2,69 µM NAA and 13,30 µM BAP

При культивировании в темноте каллус приобретал бурую окраску и был неморфогенным. Установлено, что наличие в питательной среде цитокинина в отсутствии ауксинов вызывает снижение частоты индукции образования каллуса в 2-3 раза. При этом увеличение концентрации НУК приводит к замедлению образования адвентивных почек и микророзеток в культуре сегментов соцветий *B. riger elatior*.

Частота регенерации растений зависит не только от генотипа и типа эксплантa, но и от длительности культивирования каллуса. Было установлено, что формирование микророзеток активно происходит в каллусных культурах, полученных из сегментов соцветий и основания цветоложа.

Так, средняя частота регенерации из каллуса 1-го пассажа сортов Krefeld и Schwabenland составляла 80-84%, а у сортов Nixi red, Nixi rose и Lorrenie – 70-73%. Получение регенерантов в значительной степени лимитируется количеством пассажей культивируемого каллуса. У большинства сортов *B. riger elatior* индукция морфогенеза

ограничивается 1-2 пассажами. У сорта Krefeld формирование адвентивных почек и микропобегов наблюдали до 3-4 пассажа. При более длительном культивировании после 5-7 пассажей наблюдали формирование аномальных нежизнеспособных микророзеток и снижение частоты регенерации.

В результате проведения экспериментов с различными концентрациями БАП на фоне постоянных концентраций 2,69 мкМ и 1,14 мкМ ИУК было выявлено, что применение БАП в концентрации 4,40 мкМ в среде Б активно индуцировало развитие адвентивных почек и микророзеток в каллусной культуре *B. riger elatior* (рис. 9).

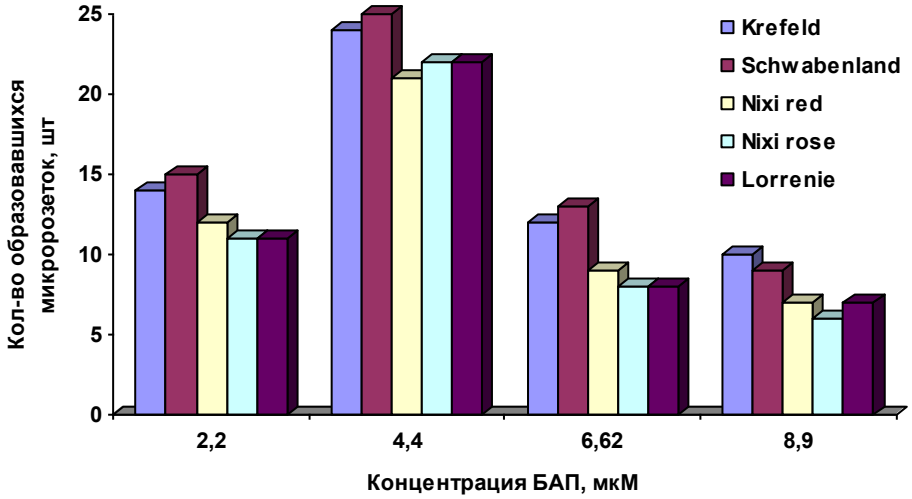


Рис. 9 Влияние концентрации БАП на регенерацию микророзеток *B. riger elatior* изучаемых сортов (2,69 мкМ НУК и 1,14 мкМ ИУК)
Fig. 9 Influence of BAP concentrations on microrosettes regeneration of studied cultivars in *B. riger elatior* (2,69 µM NAA and 1,14 µM IAA)

Спустя 2-3 недели формируются микророзетки с 2-4 листочками. Для дальнейшего повышения коэффициента размножения конгломераты микророзеток рассекают на части и субкультивируют на свежеприготовленную среду. При этом повышение концентрации БАП до 13,3 мкМ для увеличения частоты регенерации тормозит процесс формирования микророзеток у всех исследуемых сортов. На этапе размножения возникает проблема разделения плотно прижатых друг к другу микророзеток. Нами было установлено, что причиной этому является недостаток или полное отсутствие сульфата цинка в питательной среде. Показано, что для нормального развития микророзеток оптимальной концентрацией сульфата цинка в питательной среде является 61,96 мкМ. Использование ГК в концентрации 2,89 мкМ при совместном применении с БАП, НУК и ИУК также способствует вытягиванию и росту микророзеток, а также их разделению для укоренения.

Наряду с трофическими и гормональными факторами физические факторы, такие как интенсивность освещения, фотопериод и температура оказывают значительное влияние на регенерацию растений *B. riger elatior*. Установлено, что эффективность прямого органогенеза в культуре изолированных листовых эксплантов двух сортов повышается при интенсивности освещения 2-3 клк. При этом в среднем 85,6% высечек листа сорта Krefeld и 94,6% сорта Schwabenland активно формируют адвентивные почки и микророзетки. Полученные микророзетки не имеют морфологических отклонений. Снижение интенсивности освещения до 1 клк, а также ее повышение до 4-5 клк значительно уменьшает частоту регенерации микророзеток у сортов Krefeld и Schwabenland.

Наиболее активно процессы морфогенеза в культуре изолированных сегментов соцветия происходят на свету. В отсутствии освещения или при слабом освещении в пределах от 1 клк и ниже отмечают замедление формирования морфогенного каллуса. В этом случае частота каллусогенеза составляет 35%. При интенсивности освещения от 2 до 3 клк 88-96% исходных эксплантов изучаемых сортов формируют морфогенный каллус. С увеличением интенсивности освещения до 4-5 клк наблюдают резкое уменьшение частоты каллусообразования. По своей консистенции полученный каллус часто бывает оводненным, а развившиеся впоследствии микророзетки имеют различные аномальные отклонения и погибают.

Наряду с этим было отмечено, что важным фактором, влияющим на микроразмножение, является продолжительность освещения. Наиболее эффективным для культивирования высечек листа и сегментов соцветия *B. riger elatior* является 16-часовой фотопериод (табл. 2).

Таблица 2

Влияние продолжительности фотопериода на регенерационный потенциал листовых эксплантов и сегментов соцветий *B. riger elatior* сортов Krefeld и Schwabenland

Table 2

Influence of photoperiod length on regeneration capacity of leaf explants and segments of inflorescence in *B. riger elatior* (cvs. Krefeld and Schwabenland)

Фотопериод, ч	Среднее количество листовых эксплантов, регенерировавших микророзетки, %	Среднее количество сегментов соцветий, образовавших микророзетки, %
12	41,2 ± 3,7	56,4 ± 2,8
14	74,3 ± 4,8	72,4 ± 4,6
16	94,3 ± 4,2	96,2 ± 4,7
18	65,5 ± 4,5	67,3 ± 4,6
20	49,4 ± 2,5	52,4 ± 2,7

Изучение влияния температуры на регенерационные процессы показало, что прямой органогенез в культуре листовых эксплантов и непрямой органогенез в культуре сегментов соцветий *B. riger elatior* всех исследуемых сортов происходили при 23-25°С, что существенно облегчало процесс клонального микроразмножения (табл. 3).

Таблица 3

Влияние температуры культивирования на регенерационную способность *in vitro* высечек листа и сегментов соцветий *B. riger elatior*

Table 3

Influence of temperature during the cultivation on regeneration ability *in vitro* of leaf discs and inflorescence segments in *B. riger elatior*

Температура,°С	Среднее количество высечек листа, сформировавших микророзетки, %	Среднее количество сегментов соцветий, образовавших микророзетки, %
21	53,2 ± 2,9	49,8 ± 2,5
23	81,3 ± 3,6	83,4 ± 3,7
25	94,2 ± 4,6	96,2 ± 4,9
27	66,3 ± 4,4	66,3 ± 4,5
29	43,4 ± 3,7	40,4 ± 3,6

Проведенные эксперименты показали, что коэффициент размножения зависит не только от состава питательной среды, но и от сортовых особенностей культуры. При соблюдении равных условий культивирования *in vitro* активно развивались сорта Krefeld и Schwabenland (красные, не махровые) и значительно сложнее сорта Nixi red и Nixi rose, (с махровыми цветами); среднее количество микророзеток на эксплант составляло 30,2±5,2 шт. у сорта Krefeld, 31,3±1,7 шт. у сорта Schwabenland, 27,9±1,2 шт. у сорта Nixi red, 26,6±1,2 шт. у сорта Nixi rose и 21,3±2,7 шт. у сорта Lorrenie (рис. 10). Длительное культивирование микророзеток на среде с БАП вызывало замедление роста, поэтому перед этапом укоренения микророзетки переносят на питательную среду с макро- и микроэлементами в половинной концентрации, исключив из состава среды цитокинин (рис. 11).

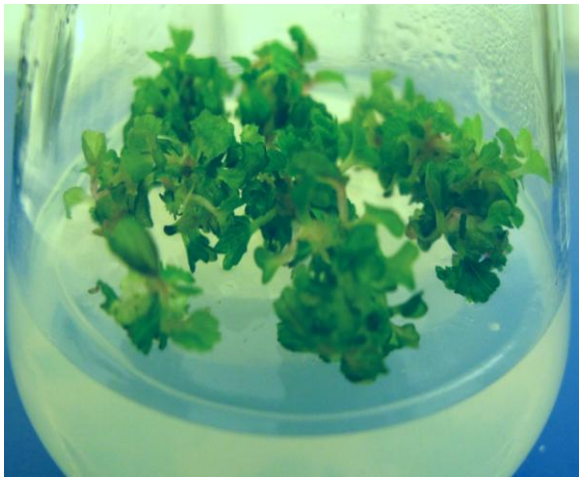


Рис. 10 Массовая регенерация микророзеток *B. riger elatior* сорта Lorrenie на среде Б
Fig. 10 Mass regeneration of microrosettes of *B. riger elatior* cv. Lorrenie on medium B

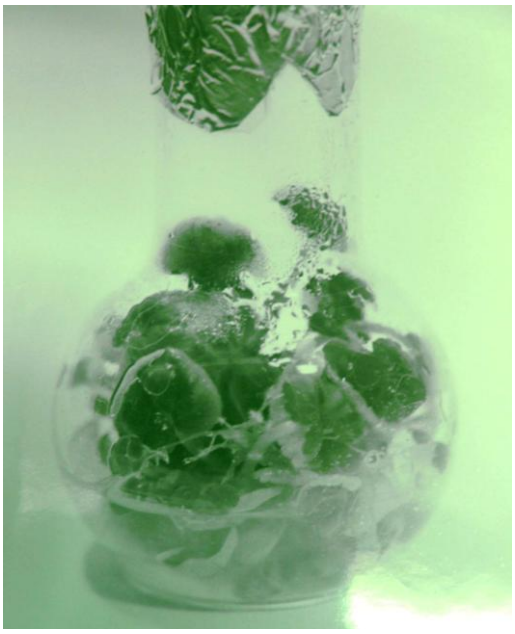


Рис. 11 Микропобеги *B. riger elatior* на безгормональной среде перед этапом укоренения *in vitro*
Fig. 11 Microshoots of *B. riger elatior* on hormon-free medium before the rooting stage *in vitro*

Для стимуляции ризогенеза используют вещества ауксиновой природы (ИМК, НУК и ИУК) в различных концентрациях. Микророзетки *B. riger elatior* переносят на среду С, содержащую макро- и микросоли, витамины. 100%-ное укоренение микророзеток наблюдали в присутствии 4,90 мкМ ИМК в питательной среде С. Корнеобразование в большинстве случаев происходит у основания микророзеток. Спустя 14 суток среднее количество корней составляет 4,15 ± 1,2 шт. на побег, а их средняя длина – 2,51 ± 1,2 см (табл. 4). Введение в питательную среду 5,71-11,42 мкМ ИУК вместо ИМК оказывало аналогичное действие. Применение в составе питательной среды 0,54 мкМ НУК вызывает образование каллуса в основании микророзеток, который препятствует закладке корней. Так каллусогенез и ризогенез оказались конкурирующими процессами.

Миниатюрные регенеранты с хорошо развитыми корнями через 6 недель культивирования пикируют в вазоны с адаптационным субстратом, состоящим из торфа и перлита в соотношении 2:1 при pH 5,5 и содержат в условиях, приближенных к тем, что они имели в культуре *in vitro* (рис. 12). Частота приживаемости регенерантов

составляла 87-90% в зависимости от сорта. Цветение молодых растений *B. riger elatior* начиналось после достижения ими высоты 12 см (рис. 13).

Таблица 4

Влияние концентрации ИМК на укоренение растений *B. riger elatior* в условиях *in vitro*

Table 4

Influence of IBA concentration on plants rooting of *B. riger elatior* in conditions *in vitro*

Концентрация ИМК, мкМ	Количество корней, шт.	Длина корней, см	Частота укоренения, %
2,95	2,89 ± 1,1	1,96 ± 1,3	35,0 ± 1,9
3,49	3,18 ± 1,1	2,12 ± 1,0	63,12 ± 1,5
4,90	4,15 ± 1,2	2,51 ± 1,2	100
7,36	7,86 ± 1,8	3,23 ± 1,1	45,0 ± 1,9

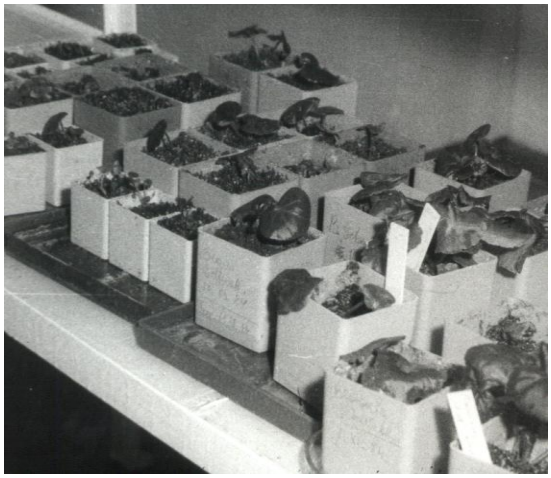


Рис. 12 Адаптированные растения *B. riger elatior*
Fig. 12 Adapted plants of *B. riger elatior*

Рис. 13 Цветущее растение *B. riger elatior* сорта Nixi rose
Fig. 13 Flowering plants of *B. riger elatior* (cv. Nixi rose)

Растения, полученные в условиях *in vitro,* были здоровыми и обладали способностью к массовому нарастанию листьев, которые можно использовать для традиционного вегетативного размножения.

Индукция побегообразования в культуре листовых эксплантов S. ionantha

Известно, что при микроразмножении *S. ionantha* в качестве исходных эксплантов используют листовые диски, сегменты черешка и цветки [28, 62]. Однако часто в процессе клонального микроразмножения возникают трудности при размножении определенных гибридных сортов, что требует дифференцированного подхода в каждом конкретном случае.

В процессе выполнения исследований разрабатывались биотехнологические приемы клонального микроразмножения двух форм гибридных *S. ionantha* (зеленолистных и пестролистных) на основе культуры высечек листа. С этой целью исследовали особенности морфогенеза и регенерации растений в культуре листовых эксплантов, зависимость коэффициента размножения от состава питательной среды и генотипа, подбирали условия для адаптации растений.

После стерилизации полностью раскрытые листья *S. ionantha* разрезают вдоль центральной жилки и вычленяют высечки листа так, чтобы каждая из них имела крупную жилку. В процессе культивирования листовых эксплантов мы не обнаружили принципиальных различий в прохождении отдельных этапов морфогенеза в

зависимости от генотипа. Отличия касались количественной характеристики процесса и окончательного выхода регенерантов.

Первичные экспланты размером 1 х 1 см помещают в колбы на поверхность агаризованной питательной среды S 1 (рис. 14), содержащей макро- и микроэлементы по МС в половинной концентрации, 8,61 мкМ глицина, 555,1 мкМ мезоинозита, 0,29 мкМ тиамина-HCl, 2,96 мкМ пиридоксина-HCl, 4,06 мкМ никотиновой кислоты, 3% сахарозы, 0,8% агара, дополненной различными комбинациями и концентрациями цитокининов (1,39-5,93 мкМ кинетина, 1,33-3,11 мкМ БАП) и ауксинов (0,57-8,56 мкМ ИУК и 0,54-2,69 мкМ НУК), а также на контрольную среду S 1 без регуляторов роста (табл. 5).

Таблица 5

Составы питательных сред для разных этапов регенерации растений в культуре листовых эксплантов *S. ionantha*

Table 5

Compositions of media for different stages of plant regeneration in leaf explants culture of *S. ionantha*

Компоненты	Индукция побегообразования S 1	Собственно микроразмножение S 2	Ризогенез S 3
Макросоли, мг/л:			
NH_4NO_3	825	825	825
KNO_3	950	950	950
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	220	220	220
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	185	185	185
KH_2PO_4	85	85	85
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	13,9	13,9	13,9
Na_2ЭДТА$\cdot 2H_2O$	18,65	18,65	18,65
Микросоли, мг/л:			
H_3BO_3	3,1	3,1	3,1
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	11,2	11,2	11,2
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,0125	0,0125	0,0125
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0125	0,0125	0,0125
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	4,3	4,3	4,3
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,125	0,125	0,125
KI	0,415	0,415	0,415
Витамины, мкМ:			
Глицин	8,61	8,61	8,61
Тиамин-HCl	0,29	0,29	0,29
Пиридоксин-HCl	2,96	2,96	2,96
Никотиновая к-та	4,06	4,06	4,06
Мезоинозит	555,1	555,1	555,1
Регуляторы роста, мкМ:			
БАП	2,22	0,44	-
НУК	0,54	-	-
Сахароза, г/л	30,0	30,0	30,0
Агар, г/л	8,0	8,0	8,0

Проведенные эксперименты показали, что при отсутствии в питательной среде S 1 регуляторов роста регенерация адвентивных почек и микророзеток изучаемых форм не происходит. Установлено, что при размножении сортов гибридных *S. ionantha* необходимым условием регенерации микророзеток является сочетание ауксина и цитокинина в питательной среде.

В результате проведенных исследований выявлено, что сочетание БАП и НУК активно индуцировали прямую регенерацию микророзеток из высечек листа у изучаемых сортов *S. ionantha*. Установлена эффективность БАП и НУК в концентрациях 2,22 мкМ и 0,27-1,07 мкМ соответственно для адвентивного

побегообразования (рис. 15). Массовое формирование адвентивных почек и микророзеток наблюдали через 2-3 недели культивирования в местах соприкосновения высечек листа изучаемых сортов с модифицированной средой S 1. Показано, что регенерация микророзеток происходит как при низких, так и при высоких концентрациях БАП. Увеличение частоты регенерации наступало спустя 8 недель культивирования листовых эксплантов и достигало 90% у пестролистных и 96% у зеленолистных форм. При этом среднее количество микророзеток на эксплант у зеленолистных форм составило 20-25 штук, а у пестролистных – 15-20 штук (рис. 16). В ходе проведения экспериментов было установлено, что листовые экспланты зеленолистных крупноцветковых *S. ionantha* обладают большей регенерационной способностью, чем экспланты пестролистных, что характерно и для вегетативного размножения в условиях закрытого грунта.

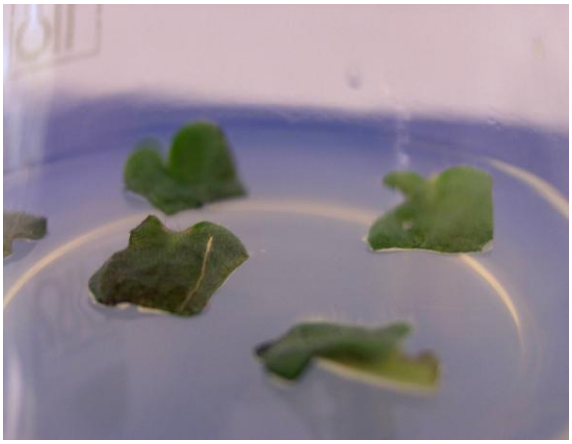


Рис. 14 Листовые экспланты *S. ionantha* на модифицированной питательной среде S 1, дополненной 2,22 мкМ БАП и 0,54 мкМ НУК
Fig. 14 Leaf explants of *S. ionantha* on modified medium S 1 with 2,22 µM BAP and 0,54 µM NAA

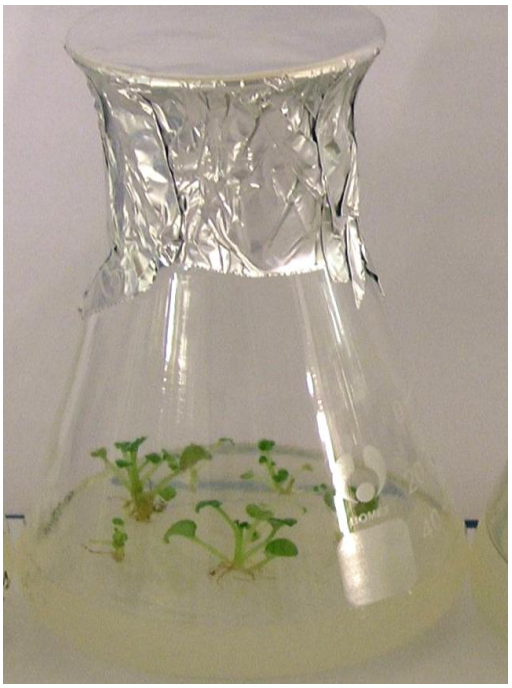
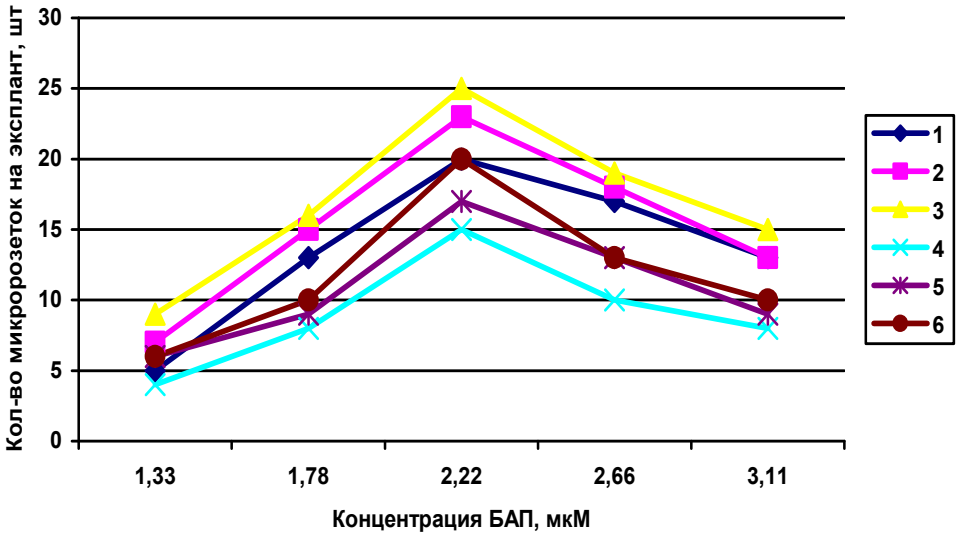


Рис. 15 Регенерация микророзеток *S. ionantha* на питательной среде S 1, дополненной 2,22 мкМ БАП и 0,27-1,07 мкМ НУК
Fig. 15 Microrosettes of *S. ionantha* regeneration on medium S 1 with 2,22 µM BAP and 0,27-1,07 µM NAA

При дальнейшем увеличении концентрации БАП до 2,66-3,11 мкМ у микророзеток наблюдалась деформация листовых пластинок, а в отдельных вариантах опыта отмечали образование рыхлого каллуса. С увеличением концентрации НУК до 1,61-5,37 мкМ отмечено спонтанное формирование корней у зеленолистых форм.

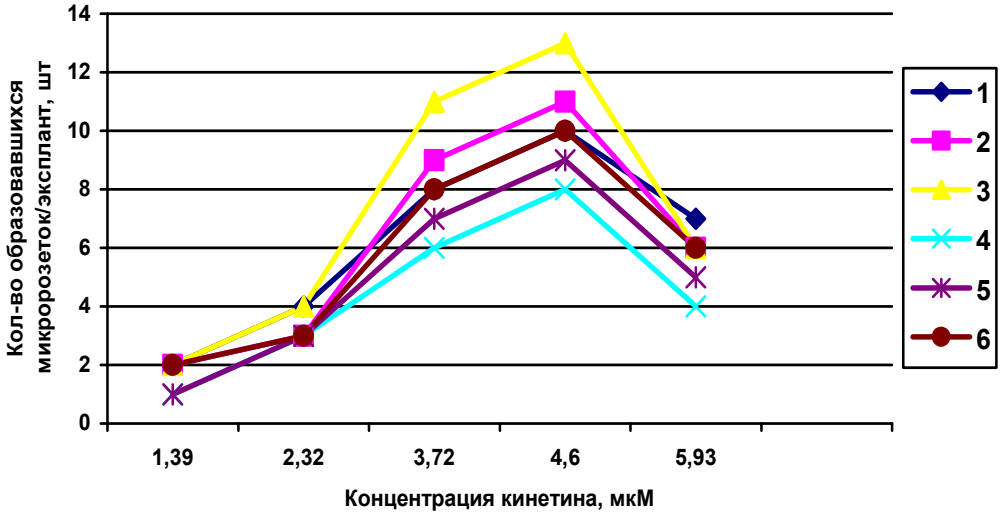
В то же время установлено, что наличие в питательной среде в качестве регуляторов роста 2,32-4,60 мкМ кинетина и 2,85-5,71 мкМ ИУК способствовало формированию небольшого числа микророзеток (8-10 штук/эксплант у пестролистных и 10-13 – у зеленолистных), имеющих корни длиной 0,4-0,6 см (рис. 17). Применение кинетина и ИУК приводило к замедлению начала процесса адвентивного побегообразования, по сравнению с БАП и НУК, в среднем на 8-10 суток. Таким образом, результаты экспериментов показали, что наличие в питательной среде S 1 кинетина

замедляет процесс регенерации микропобегов на листовых эксплантах гибридных *S. ionantha*, при этом образуется меньшее количество микророзеток на эксплант.



1 – сорт Alocha Orchid, 2 – сорт Ruffled Skyes, 3 – сорт Ruffles Snow Rose, 4 – сорт Apachi Midnight, 5 – сорт Margery's Melody, 6 – сорт Ness Orange Pekoe

Рис. 16 Влияние концентрации БАП на образование микророзеток *S. ionantha* зеленолистных форм (1-3) и пестролистных форм (4-6) на модифицированной среде S 1
Fig. 16 Influence of BAP concentrations on microrosettos of *S. ionantha* formation of green leaved forms (1-3) and motley leaved forms (4-6) on modified medium S 1



1 – сорт Alocha Orchid, 2 – сорт Ruffled Skyes, 3 – сорт Ruffles Snow Rose, 4 – сорт Apachi Midnight, 5 – сорт Margery's Melody, 6 – сорт Ness Orange Pekoe

Рис. 17 Влияние концентрации кинетина в модифицированной питательной среде S 1 на образование микророзеток *S. ionantha* зеленолистных форм (1-3) и пестролистных форм (4-6)
Fig. 17 Influence of kinetin concentrations in modified medium S 1 on formation of microrosettos in *S. ionantha* of green leaved forms (1-3) and motley leaved forms (4-6)

В ходе выполнения экспериментов были выявлены некоторые особенности процесса органогенеза у сортов растений *S. ionantha* с пестрыми листьями. Установлено, что пестролистность сохраняется при размножении сортов, листовые экспланты которых на этапе введения на питательную среду содержат не меньше 45-

50% хлорофильных участков. Способность к регенерации микророзеток у таких эксплантов ниже, чем у зеленолистных при культивировании на средах одинакового состава. Основная масса микророзеток регенерирует в зелено окрашенных участках эксплантов.

В результате проведенных экспериментов была выявлена зависимость регенерационной способности высечек листа двух форм *S. ionantha* от размера и ориентации экспланта на поверхности питательной среды. Известно, что для эксплантов из ткани листа оптимальные размеры составляют 0,8 х 0,8 – 1 х 1 см [6]. При использовании нами высечек листа размером 0,4 х 0,4 см у двух форм гибридной *S. ionantha* наблюдали низкую жизнеспособность тканей вследствие стресса, вызванного стерилизующим агентом. В среднем только 27-31% таких эксплантов образовывали адвентивные почки и микропобеги в культуре *in vitro*. Исходные экспланты оптимального размера 1 х 1 см активно развивались в культуре *in vitro* – в среднем 92% листовых эксплантов зеленолистных и 89% пестролистных форм регенерировали микропобеги. При этом экспланты размером больше оптимальных (1,5 х 1,5 см) характеризовались высокой степенью жизнеспособности, однако первичная регенерация начиналась на 10-12 суток позже и в среднем только 53% листовых эксплантов зеленолистных и 50% пестролистных форм регенерировали микропобеги в культуре *in vitro*.

В ходе экспериментов изучено влияние расположения высечек листа изучаемых сотов *S. ionantha* на поверхности питательной среды на способность к регенерации микророзеток. Высечки листа размещают абаксиально и адаксиально к поверхности питательной среды. Установлено, что абаксиальное и адаксиальное расположение эксплантов на питательной среде оказывает заметное влияние на частоту регенерации микророзеток. Так, адаксиальное расположение эксплантов на поверхности среды увеличивает частоту регенерации к концу 8-й недели культивирования до 98% у зеленолистных форм и 95% у пестролистных; при абаксиальном – до 75% и до 70% соответственно. У всех изучаемых сортов микропобеги регенерируют без этапа образования каллуса, что обеспечивает генетическую стабильность полученных растений.

Важным для изучения морфогенеза *in vitro* является подбор условий культивирования. Изолированные экспланты листа первые две недели культивирования находятся в термостате при температуре 28ºС – до появления адвентивных почек по краям высечки листа, а затем их переносят в культуральное помещение с температурой 23±1ºС, 16-часовым фотопериодом, интенсивностью освещения 2-3 клк и относительной влажностью воздуха 70% (рис. 18).

Способность к регенерации у эксплантов, прошедших период развития в отсутствии освещения не снижалась, а наоборот возрастала: микророзетки развивались более однородно. Формирование адвентивных почек у листовых эксплантов происходило и при освещении, но процесс замедлялся на 1,5-2 недели.

В процессе постановки опытов было выявлено влияние интенсивности освещения и качества света на частоту регенерации микророзеток на высечках листа зеленолистных и пестролистных форм *S. ionantha*. При интенсивности освещения 1-1,5 клк наблюдают резкое снижение регенерационной способности высечек листа: только 32% пестролистных и 35% зеленолистных были способны к регенерации микророзеток в условиях *in vitro*. Наиболее эффективный уровень освещения составил 2-3 клк, при котором 87% пестролистных и 94% зеленолистных сортов регенерировали микророзетки. Частота регенерации и количество образовавшихся микророзеток в культуре *in vitro* уменьшались с увеличением интенсивности освещения до 4-5 клк. Следует, что только часть эксплантов была способна регенерировать микророзетки, которые в дальнейшем

чаще всего погибали. Количество микророзеток в культуре *in vitro* увеличивалось при использовании на начальном этапе красного света, а формирование корней интенсивно происходило под действием любого света (белого, голубого, красного).

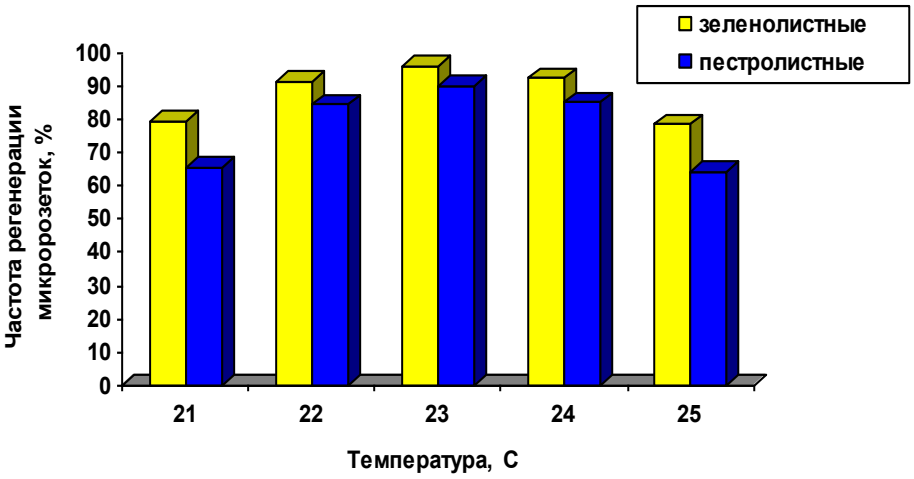


Рис. 18 Зависимость частоты регенерации микророзеток двух форм *S. ionantha* от температуры культивирования
Fig. 18 Dependence of regeneration freguency of microrosettes in two forms of *S. ionantha* on temperature during the cultivation

Сформировавшиеся микророзетки быстро разрастались по всей поверхности эксплaнта. Для дальнейшего роста и развития микророзетки отделяют, разделяют и переносят на питательную среду S 2 для собственно микроразмножения, содержащую половинную концентрацию макро- и микросолей, витамины и сахарозу по МС, дополненную 0,44 мкМ БАП (рис. 19).

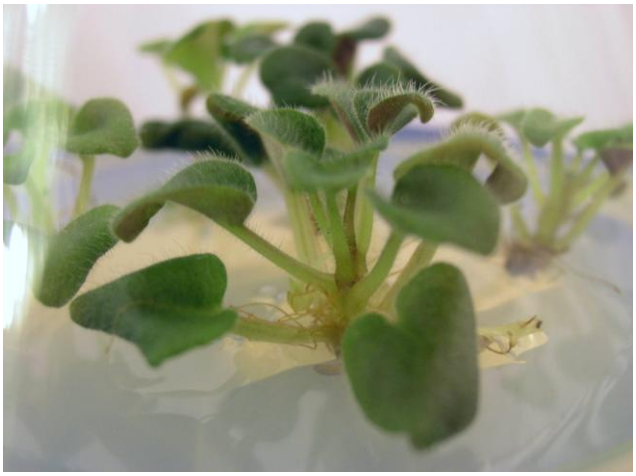


Рис. 19 Микропобеги *S. ionantha* на питательной среде S 2, дополненной 0,44 мкМ БАП
Fig. 19 Microshoots of *S. ionantha* on medium S 2 with 0,44 µM BAP

Как известно, листовые эксплaнты *S. ionantha* в культуре *in vitro* способны к органогенезу на питательной среде МС в отсутствии фитогормонов [28]. В наших экспериментах это свойство было использовано для увеличения количества регенерантов двух форм гибридных *S. ionantha*. С этой целью отделяют листья у микропобегов в культуре *in vitro,* наносят скальпелем насечки по всему периметру листа и помещают

адаксиально на поверхность безгормональной питательной среды S 1, где через 2-2,5 недели происходит массовое образование адвентивных почек и формирование микророзеток. При сопоставлении результатов процесса адвентивного побегообразования в культуре листовых эксплантов изучаемых сортов можно сделать заключение, что регенерационная способность эксплантов *in vitro* у эксплантов зеленолистных форм оказалась выше, чем аналогичных листовых эксплантов с пестрыми листьями.

Результаты проведенных экспериментов показали, что культивирование микропобегов на безгормональной питательной среде ½ нормы солей по МС способствовует нормальному росту микророзетки с одновременным формированием корней. При этом процент укоренившихся микропобегов зависит от сортовых особенностей. Частота укоренения микророзеток сортов зеленолистных форм составляла 91-98%, в то время как микророзетки пестролистных форм проявили пониженную способность к укоренению (73-88%). Во всех вариантах отмечали формирование в среднем от 4,0 ± 0,6 шт. до 6,1 ± 0,8 шт. корней на микророзетку со средней длиной 1,5 ± 0,6 см - 2,1 ± 0,7 см. Через 3 недели их переносят на адаптацию. Адаптированные к условиям *in vivo* растения *S. ionantha* изучаемых сортов переносят в теплицу, где после высадки в вазоны через 3-3,5 месяца они зацветают (рис. 20).

В культуре пестролистные формы несколько отличались от зеленолистных форм (рис. 21). Прежде всего, из-за недостатка хлорофилла такие растения развивались медленнее, так как в процессе фотосинтеза участвовали только зеленые части листа и на них приходилась вся нагрузка по питанию растения. Поэтому пестролистным формам надо было обеспечить достаточное освещение. Продолжительность фотопериода составляла 12-14 часов. Излишнее освещение приводило к уменьшению пестрой окраски за счет выработки избытка хлорофилла.

Рис. 20 Цветущие растения *S. ionantha*
Fig. 20 Flowering plants *S. ionantha*

Рис. 21 Пестролистные формы *S. ionantha*
Fig. 21 Motley leaved forms of *S. ionantha*

Растения, высаженные в условия закрытого грунта, не имели морфологических отклонений от родительских форм и сортов. Это дало возможность получить элитный материал, идентичный интактным растениям. Процесс микроразмножения сортов гибридных *S. ionantha* занимал 7-8 месяцев от посадки экспланта на питательную среду *in vitro* до цветения. Из одного листа можно получить до 500 регенерантов, при повторных пассажах – в 2-3 раза больше.

Особенности регенерации растений из эксплантов листа C. hortulanum

В ходе выполнения исследований предполагалось разработать и усовершенствовать биотехнологические приемы клонального микроразмножения четырех изучаемых сортов на основе культуры листовых эксплантов *in vitro*.

С этой целью были изучены морфогенетические потенции листовых эксплантов *in vitro,* выявлена зависимость коэффициента размножения от состава питательной среды, подобраны условия адаптации растений *in vivo*. В качестве контроля был выбран сорт Triumphe de Compte, биотехнологическая система получения растений через органогенез и соматический эмбриогенез которого была разработана И.В. Митрофановой [11]. В наши исследования были включены кроме сорта Triumphe de Compte три новых сорта *C. hortulanum* из коллекции НБС-ННЦ: Frieda Hemple, Candidum, Gipsy Rose.

Известно, что правильный выбор первичного экспланта, способа стерилизации, экзогенных регуляторов роста, условий культивирования позволяют регулировать морфогенетические процессы в культуре органов и тканей растений и получать желаемый результат. В качестве первичных эксплантов были использованы высечки листа *C. hortulanum*. Отбор листьев исследуемых сортов, а также их введение в культуру *in vitro* проводят в период вегетации растения – с мая по сентябрь включительно. Высечки листа изучаемых сортов размером 1 х 1 см из разных частей листовой пластинки помещают на питательную среду, содержащую минеральные соли по прописи МС. Во все питательные среды добавляют 555,1 мкМ мезоинозита, 0,29 мкМ тиамина-HCl, 2,96 мкМ пиридоксина-HCl, 4,06 мкМ никотиновой кислоты, 3% сахарозы, 0,8% агара. Значение pH среды доводят до показателя 5,6. Для регулирования регенерационных процессов *in vitro* в питательную среду добавляют 1,36-5,56 мкМ зеатина, 1,39-4,60 мкМ кинетина и 5,37 мкМ НУК, 0,89-4,40 мкМ 6-БАП и 1,07-5,37 мкМ НУК, 0,98-2,46 мкМ ИМК. Высечки листа культивируют в термостате при температуре 25ºС в отсутствии освещения, а также в культуральной комнате на свету при постоянной температуре 24±1ºС, интенсивности освещения 2-3 клк, 16-часовом фотопериоде и относительной влажности воздуха 70%.

В ходе выполнения исследований были определены зоны листовой пластинки, обладающие высоким морфогенетическим потенциалом. Высечки листа вычленяют из различных зон полностью раскрытого листа. Экспериментально установлено, что у всех изучаемых сортов максимальной способностью к морфогенезу обладают зона соединения листовой пластинки с черешком, а также область по обе стороны от центральной жилки (рис. 22). Экспланты, изолированные из других частей листовой пластинки обладали низким регенерационным потенциалом.

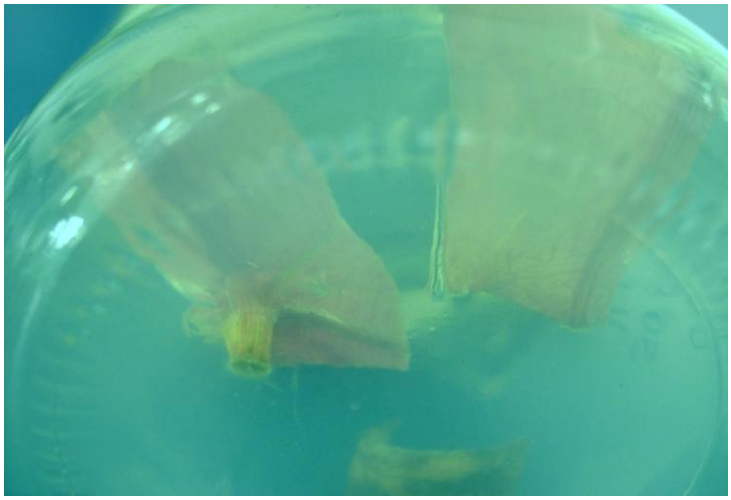


Рис. 22 Первичные экспланты *C. hortulanum*, способные к морфогенезу в условиях *in vitro*
Fig. 22 Primery explants of *C. hortulanum* able for morphogenesis in conditions *in vitro*

В процессе проводимых нами исследований был модифицирован состав питательной среды МС (Cl 1 и Cl 2) и подобраны оптимальные концентрации

цитокинина для индукции морфогенетических процессов в тканях листа (табл. 6). Значение pH среды доводили до показателя 5,6.

Таблица 6

Составы питательных сред для разных этапов морфогенеза в культуре листовых эксплантов *C. hortulanum* в условиях *in vitro*

Table 6

Compositions of media for different stages of morphogenesis in culture of leaf explants for *C. hortulanum* in conditions *in vitro*

Компоненты	Индукция соматического эмбриогенеза Cl 1	Индукция органогенеза Cl 2	Ризогенез Cl 3
Макросоли, мг/л:			
NH_4NO_3	1650	1650	825
KNO_3	1900	1900	950
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440	440	220
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	370	185
KH_2PO_4	170	170	85
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8	27,8	13,9
Na_2ЭДТА$\cdot 2H_2O$	37,3	37,3	18,65
Микросоли, мг/л:			
H_3BO_3	6,2	6,2	3,1
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22,3	22,3	11,15
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025	0,025	0,0125
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025	0,025	0,0125
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,6	8,6	4,3
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25	0,25	0,125
KI	0,83	0,83	0,415
Витамины, мкМ:			
Глицин	8,61	8,61	8,61
Тиамин-HCl	0,29	0,29	0,29
Пиридоксин-HCl	2,96	2,96	2,96
Никотиновая к-та	4,06	4,06	4,06
Мезоинозит	555,1	555,1	555,1
Регуляторы роста, мкМ:			
БАП	-	2,22-2,66	-
Кинетин	2,32-3,25	-	-
НУК	5,37	2,69	-
ИМК	-	-	2,46
Сахароза, г/л	30,0	30,0	30,0
Агар, г/л	8,0	8,0	8,0

В качестве веществ цитокининового типа действия используют БАП, кинетин и зеатин. В ходе предварительных экспериментов было установлено, что использование зеатина не оказывает индуцирующего воздействия на процессы формирования меристемоидов. Была отмечена положительная роль кинетина и БАП. Так среди испытанных нами концентраций кинетина (1,39-4,60 мкМ) эффективной была концентрация 2,32-3,25 мкМ, при которой формировались соматические зародыши на 69,3% высечек листа сорта Gipsy Rose, 69,9% – сорта Triumphe de Compte, 70,2% – сорта Frieda Hemple и 74,2% – сорта Candidum (табл. 7). Для сорта Candidum оптимальная концентрация кинетина по сравнению с остальными сортами была выше и составляла 3,25 мкМ. Это по-видимому, связано с наличием большого количества участков листа, не имеющих зеленой окраски.

На 28-35 сутки культивирования листовых эксплантов в условиях *in vitro* по краям высечек листа активно формировались глобулярные структуры без этапа

каллусообразования. Следует отметить, что наиболее продолжительный период формирования соматических зародышей (свыше 35 сут) был характерен для листовых эксплантов сорта Candidum.

Таблица 7

Влияние различных концентраций кинетина на эмбриогенный потенциал высечек листа сортов *C. hortulanum* на питательной среде, дополненной 5,37 мкМ НУК

Table 7

Influence of different kinetin concentration on embryogenic capacity of leaf discs for cultivars of *C. hortulanum* on medium with 5,37 µM NAA

Концентрация кинетина, мкМ	Количество эксплантов, образовавших соматические эмбриоиды, %			
	сорт Triumphe de Compte	сорт Frieda Hemple	сорт Candidum	сорт Gipsy Rose
1,39	13,9 ±3 ,6	8,3 ± 3,1	11,3 ± 3,4	7,5 ± 2,8
2,32	69,9 ±5,7	70,2 ± 5,7	51,2 ± 3,8	69,3 ± 5,7
3,25	37,3 ± 5,1	34,3 ± 4,9	74,2 ± 4,9	36,9 ± 5,1
4,60	18,4 ± 4,2	17,4 ± 4,2	38,3 ± 5,1	20,1 ± 4,2

В процессе выполнения исследований установлено, что реализация морфогенетического потенциала в значительной мере зависит от условий культивирования. Выявлено, что в отсутствии освещения на листовых эксплантах активно формируются только соматические зародыши с одновременным прорастанием побега и 2-3 корней. Установлено, что в течение 28-35 суток культивирования корни активно формировались у эмбриоидов сорта Triumphe de Compte, и менее активно – у сортов Frieda Hemple, Candidum и Gipsy Rose.

При культивировании высечек листа четырех изучаемых сортов *C. hortulanum* в условиях освещения происходило три морфогенетических процесса: органогенез в морфогенном каллусе, а также непрямой и прямой соматический эмбриогенез. Эмбриогенные структуры в основном активно формировались в местах соединения листовой пластинки с черешком (рис. 23).

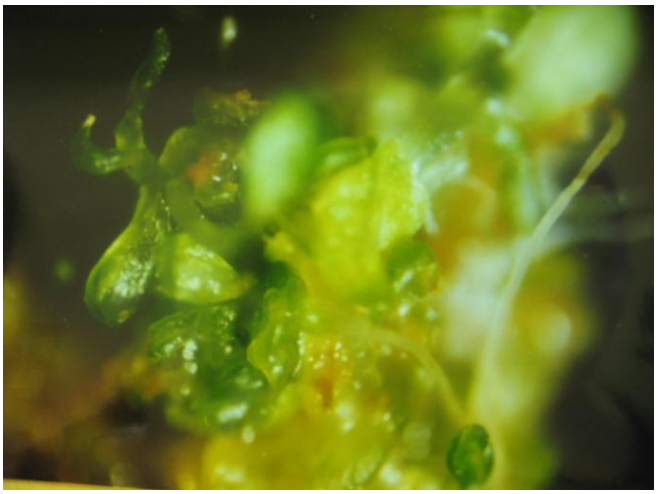


Рис. 23 Формирование эмбриогенных структур на листовых эксплантах *C. hortulanum*
Fig. 23 Formation of embryogenic structures on leaf explants of *C. hortulanum*

При культивировании эксплантов на питательной среде Cl 1, дополненной 2,32-3,25 мкМ кинетина и 5,37 мкМ НУК среднее количество соматических эмбриоидов на эксплант достигало 12±1,4 шт. у сорта Triumphe de Compte, 9,2±2,1 шт. у сорта Frieda Hemple и 9±2,1 шт. у сорта Gipsy Rose. Максимальное число эмбриоидов у сорта Candidum 11±1,4 шт. отмечали при концентрации кинетина 3,25 мкМ.

Вторичный эмбриогенез индуцируют при пассажах соматических зародышей на питательную среду Cl 1. Образование вторичных эмбриоидов наблюдали на первичных соматических зародышах, прорастающих на поверхности высечки листа. В процессе выполнения эксперимента было установлено, что на питательной среде Cl 1 развитие растений происходило довольно медленно. Для массового получения растений из эмбриоидов концентрацию НУК в питательной среде в дальнейшем уменьшили до 0,27 мкМ.

При этих условиях культивирования все соматические зародыши формируют полноценные растения (рис. 24). Увеличение или уменьшение концентрации НУК в среде снижает частоту регенерации. Продолжительность процесса от введения первичного экспланта в условия *in vitro* до регенерации растений составляет 3-3,5 месяца в зависимости от сорта.

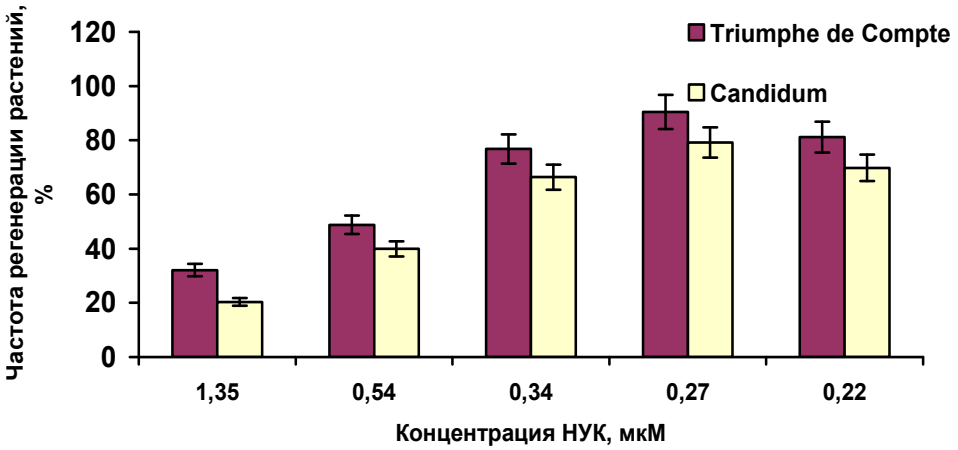


Рис.24 Влияние концентрации НУК на частоту регенерации растений из соматических зародышей двух сортов *C. hortulanum*
Fig. 24 Ifluence of NAA concentration on freguency of plant regeneration from somatic embryos of two cultivars of *C. hortulanum*

Известно, что для индукции прямой и непрямой регенерации растений из высечек листа используют питательные среды, в которых соотношение ауксина и цитокинина равняется 1:1 [20, 50, 69]. При культивировании высечек листа на питательной среде Cl 2 с БАП и НУК было выявлено различие в процессах морфогенеза. Так адвентивные почки и микропобеги *C. hortulanum* сортов Triumphe de Compte и Candidum формировались по периметру высечки листа непосредственно из ткани экспланта, в то время как у сортов Frieda Hemple и Gipsy Rose меристемоиды образовывались после этапа каллусообразования. Через 30 суток от начала культивирования на листовых эксплантах сортов Frieda Hemple и Gipsy Rose наблюдали активную пролиферацию каллуса светло-зеленого цвета по периметру всего экспланта. После этапа каллусообразования через 16-18 суток отмечали появление многочисленных меристемоидов. Первые микропобеги у сорта Gipsy Rose регенерировали в среднем через 4-5 суток, а у сорта Frieda Hemple – через 5-7 суток культивирования каллуса с меристемоидами.

После отделения микропобегов от каллуса в их основании начинали активно формироваться новые адвентивные почки. Количество адвентивных микропобегов достигало в среднем 18 штук на эксплант у сорта Frieda Hemple и 15 штук – у сорта Gipsy Rose.

У листовых эксплантов *C. hortulanum* сортов Triumphe de Compte и Candidum адвентивные почки развивались по краю высечки листа без этапа каллусообразования. На основе проведенной серии опытов выявлены эффективные концентрации регуляторов роста, регулирующие прямую регенерацию микропобегов двух исследуемых сортов. Активное образование адвентивных почек по краям высечек листа наблюдали на питательной среде Cl 2, содержащей в качестве регуляторов роста БАП и НУК. При этом процесс прямой регенерации микропобегов отмечали как при низких концентрациях БАП, так и при высоких, но с различной скоростью и частотой Установлено, что эффективной для сорта Triumphe de Compte оказалась концентрация 2,22 мкМ БАП. В этом случае адвентивные почки и микропобеги формировались на 92,3% высечек листа сорта Triumphe de Compte. Лучшей для сорта Candidum оказалась концентрация БАП 2,66 мкМ, при которой 90,1% высечек листа образовывали микропобеги. Растения имели нормальную морфологию, ярко зеленую окраску (рис. 25).

Рис. 25 Регенеранты *C. hortulanum* сорта Candidum, полученные в результате органогенеза из высечек листа
Fig. 25 Regenerants of *C. hortulanum* (cv. Candidum) obtained due to organogenesis from leaf disks

Увеличение концентрации БАП до 3,11 мкМ снижает регенерационный потенциала и замедляет рост каллуса. Полученные микропобеги часто имеют утолщенные стебли и мелкие листья на длинных черешках.

Установлена зависимость регенерационной способности листовых эксплантов *C. hortulanum* сортов Triumphe de Compte и Candidum от их расположения на поверхности питательной среды. Высечки листа располагают на поверхности питательной среды абаксиально и адаксиально. Адаксиальное расположение листовых эксплантов на поверхности питательной среды увеличивает частоту регенерации по сравнению с абаксиальным. Через 8 недель от начала культивирования 92,3% листовых эксплантов сорта Triumphe de Compte и 90% – сорта Candidum активно регенерировали микропобеги непосредственно из ткани листа без этапа каллусообразования.

В процессе выполнения экспериментов также установлено, что листовые экспланты сорта Candidum обладали меньшим морфогенным потенциалом по

сравнению с эксплантами сорта Triumphe de Compte. Возможно, это связано с наличием на поверхности листа растения большого количества участков, не имеющих хлорофилла.

Непрямой соматический эмбриогенез осуществляют на питательной среде Cl 2, дополненной 2,22 - 2,66 мкМ БАП и 2,69 мкМ НУК. При этом в условиях освещения происходит дедифференциация эксплантов листа, формирование каллуса, а затем в процессе вторичной дифференциации образуются соматические зародыши. Появление эмбриоидов было отмечено на 7 сутки после образования каллуса на листовых эксплантах. В этом случае формировались глобулярные зародыши с темно-зеленой окраской. Одновременно образовывались новые соматические зародыши и из эмбриоидов развивались растения (рис. 26).

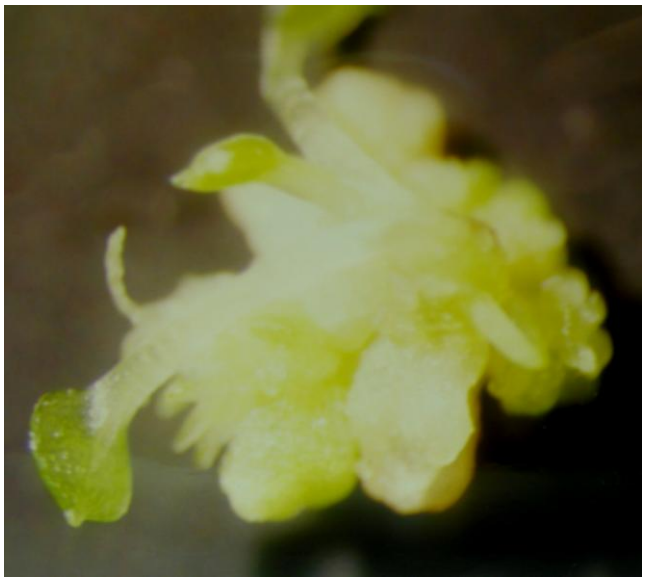


Рис. 26 Одновременное образование соматических зародышей и регенерация растений в каллусе *C. hortulanum* сорта Frieda Hemple на питательной среде, дополненной 2,22 - 2,66 мкМ БАП и 2,69 мкМ НУК

Fig. 26 Simultaneous formation of somatic embryos and plant regeneration in callus of *C. hortulanum* (cv. Frieda Hemple) on medium with 2,22 - 2,66 µM BA and 2,69 µM NAA

Растения легко отделяютот каллуса и высаживают на адаптацию *in vivo* или продолжают дальнейшее культивирование на питательной среде с уменьшенной концентрацией НУК.

В процессе исследований было установлено воздействие физических факторов на развитие соматических зародышей и микропобегов в культуре изолированных листовых эксплантов *C. hortulanum*.

Оптимальная температура культивирования соматических зародышей, по литературным данным, находится в интервале 21-25°С [35]. Установлено, что повышение и понижение температуры культивирования не влияло столь значительно на развитие эмбриоидов. Наилучший результат был получен при температуре 25°С. Количество соматических зародышей достигало в среднем 20,4±2,6 штук на эксплант.

Наряду с этим активное образование адвентивных почек и микропобегов изучаемых сортов в процессе прямого и непрямого органогенеза отмечают при температуре 24±1°С. Полученные микропобеги были нормально сформированы, имеют ярко-зеленую окраску. Понижение температуры (21-22°С) как и ее повышение (26-27°С) замедляет процесс регенерации *in vitro*. Полученные микропобеги были утолщенными, имели удлиненные черешки листьев и светло-зеленую окраску.

Известно, что для многих видов растений соматические зародыши образуются в темноте [11, 48]. Однако в культуре изолированных листовых эксплантов *C. hortulanum* нами было отмечено, что соматические зародыши образовывались как в темноте, так и на свету. Уменьшение интенсивности освещения до 1 клк заметно снижало частоту соматического эмбриогенеза. Эффективное значение интенсивности освещения находилось в пределах 2-3 клк. В этом случае количество эмбриоидов достигало в среднем 21-22 шт. на эксплант. Полученные соматические зародыши имели ярко-зеленую окраску.

Как и соматический эмбриогенез органогенез в культуре листовых эксплантов успешно происходит при интенсивности освещения 2-3 клк. Культивируя экспланты при 1 клк отмечали уменьшение частоты регенерации микропобегов. Одновременно изменялась интенсивность окраски и увеличивалась длина черешка листовой пластинки. Вместе с тем в культуре листовых эксплантов *C. hortulanum* фотопериод 16 часов был оптимальным на всех этапах регенерации растений (рис. 27).

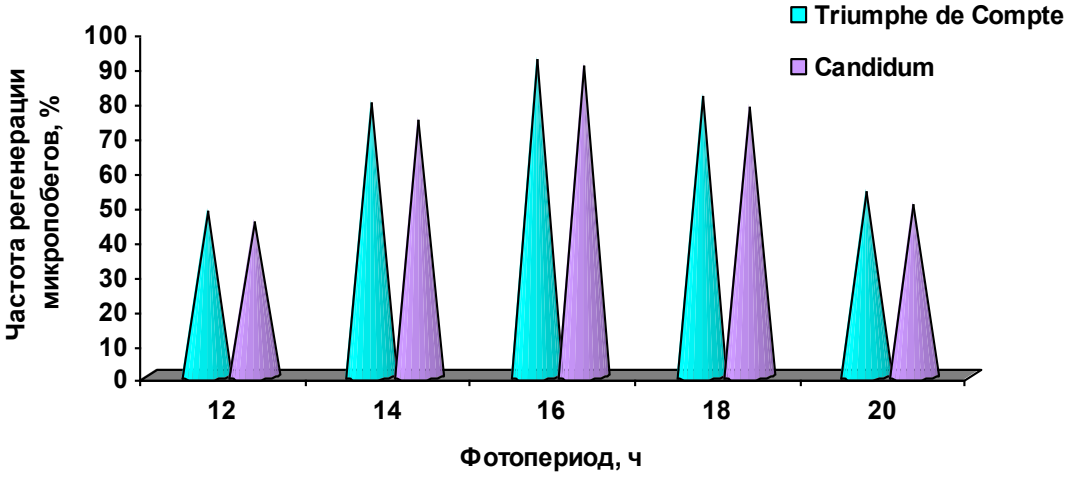


Рис. 27 Влияние длины фотопериода на регенерационную способность листовых эксплантов двух сортов *C. hortulanum* (прямая регенерация)
Fig. 27 Influence of photoperiod length on regeneration ability of leaf explants of two cultivars of *C. hortulanum* (direct regeneration)

В опытах по укоренению используют микропобеги и микророзетки четырех сортов *C. hortulanum* длиной 2-3 см, полученные в результате прямого и непрямого органогенеза. Введение в питательную среду Cl 3 (½ нормы солей по МС) НУК, ИМК, ИУК в различных концентрациях и сочетаниях для индукции ризогенеза показало, что спустя 14 суток на питательной среде Cl 3, дополненной 0,98-2,46 мкМ ИМК, появлялись первые корни. Частота ризогенеза у всех исследуемых сортов достигала в среднем 98,9%

Через 3-4 недели культивирования на данной среде образовывалось в среднем до 4 корней /эксплант, а их длина составила 6,5 см. На рис. 28 показаны регенеранты *C. hortulanum* перед высадкой в субстрат.

Растения, регенерировавшие из соматических зародышей и путем прямого органогенеза из эксплантов листа, не отличались от родительских форм по габитусу и окраске.

На адаптацию растения высаживают как группами, так и отдельно в пластиковые вазоны и кассеты. Установлено, что эффективность адаптации регенерантов в торфе и песке (3:1), а также в перлите составила 89-94% (табл. 8; рис. 29). В обоих субстратах растения активно развивались и появлялись новые листья.

Однако только 40-45% полученных регенерантов *C. hortulanum* успешно адаптировались в субстрате, состоящем из смеси торфа, листовой земли и песка (1:1:1) и 25-28% – в субстрате, состоящем из смеси торфа и песка (1:1).

Рис. 28 Растения *C. hortulanum* сорта Triumphe de Compte перед высадкой на адаптацию *in vivo*
Fig. 28 *C. hortulanum* regenerants (cv. Triumphe de Compte) before planting on adaptation *in vivo*

Таблица 8
Результаты адаптации пробирочных растений *C. hortulanum* на различных стерильных субстратах
Table 8
Results of *C. hortulanum* test tubes plants adaptation on different sterilized substrate

Тип стерильного субстрата	Количество адаптированных растений, %			
	Triumphe de Compte	Frieda Hemple	Candidum	Gipsy Rose
торф : песок (3:1)	94,4 ± 3,7	91,2 ± 4,2	89,6 ± 4,3	90,3 ± 4,0
торф : песок (2:1)	75,8 ± 2,4	71,2 ± 2,4	65,1 ± 4,5	68,5 ± 4,6
торф : песок (1:1)	28,3 ± 2,2	26,3 ± 2,1	24,9 ± 2,1	25,7 ± 2,3
торф : листовая земля : песок (1:1:1)	40,1 ± 3,7	45,3 ± 4,9	42,3 ± 3,7	42,1 ± 3,7
перлит	93,0 ± 4,7	90,4 ± 4,2	88,9 ± 4,3	89,8 ± 4,4

В таблице 9 представлены данные по получению нами растений в культуре листовых эксплантов исследуемых растений, что подтверждает перспективность использования разработанных биотехнологических методов в размножении декоративных культур.

В статье рассмотрены не только приемы клонального микроразмножения исследуемых культур при различных типах регенерации, но и представлены биотехнологические схемы клонального микроразмножения, состоящие из последовательных этапов применительно к исследуемым культурам и сортам (рис. 30-32). Эти научные разработки позволят активно развивать промышленное производство

данных растений. Вместе с тем биотехнологические приемы могут быть использованы и в практической селекции с целью размножения единичных генотипов и создания суперэлитных маточников в питомниках по производству перспективных высококачественных сортов и видов промышленных декоративных растений.

Рис. 29 Адаптация растений *C. hortulanum* на различных субстратах: а – перлит; б – торф: песок (3:1)
Fig. 29 Adaptation of *C. hortulanum* plants on different substrate: a – perlit; б – peat:sand (3:1)

Таблица 9

Сравнительная эффективность традиционного размножения и микроразмножения в культуре листовых эксплантов условиях *in vitro B. riger elatior, C. hortulanum* и *S. ionantha*

Table 9

Comparative efficiency of traditional propagation and micropropagation in culture of leaf explants *in vitro B. riger elatior, C. hortulanum* and *S. ionantha*

Растительный материал	Традиционное размножение			Микроразмножение в условиях *in vitro*			
	Способ вегетативного размножения	Выход растений в год с 1-го растения-донора, шт.	Период доращивания до товарного вида, мес	Первичный эксплант	Кол-во растений, полученных от одного эксплантa, шт.	Продолжительность размножения, мес	Период доращивания до товарного вида, мес
B. riger elatior	укоренение черенков	2-8	9-12	высечка листа 1х1 см	45-50	3-4	3-3,5
C. hortulanum	деление клубня	2-3	4-6	высечка листа 1х1 см	18	3-3,5	3
S. ionantha	укоренение черенков	5-20	8-12	высечка листа 1х1 см	20-25	7-8	3-3,5

Заключение

Установлено, что способность высечек листа и сегментов соцветий *B. riger elatior* индуцировать каллусообразование и формировать микророзетки зависит от генотипа растения, сроков отбора первичного эксплантa и условий культивирования. Показано, что наличие в питательной среде регуляторов роста (БАП, ИУК и НУК) активизирует адвентивное побегообразование, а присутствие в составе среды 2,89 мкМ ГК и 61,69 мкМ сульфата цинка способствует нормальному росту микророзеток. Наиболее эффективно регенерация микророзеток в культуре высечек листа и сегментов

Отбор первичных эксплантов для введения в условия *in vitro*
Выращивание растений-доноров при 15-18°С в условиях короткого дня в течение 3-4 недель

↓

Введение листовых эксплантов и сегментов соцветий в условия *in vitro*
Стерилизация исходного растительного материала с использованием 70%-ного раствора этилового спирта (1 мин) и 1%-ного раствора гипохлорита натрия (10 мин). Частота регенерации – 80%

↓

Вычленение эксплантов, введение их в условия *in vitro*
Первичный эксплант: высечка листа размером 1х1 см и сегмент соцветия длиной 12 мм. Высечки листа помещают на поверхность питательной среды абаксиально и адаксиально

↓

Прямая и непрямая регенерация микропобегов в условиях *in vitro*
Модифицированная питательная среда МС, дополненная 8,90-11,20 мкМ БАП и 2,85 мкМ ИУК. Среда А, дополненная 13,30 мкМ БАП и 2,69 мкМ НУК. Интенсивность освещения 2-3 клк, температура 23-25°С, 16-часовой фотопериод. Количество микорозеток на эксплант 45-50 шт.

↓

Собственно микроразмножение
Питательная среда Б с 4,40 мкМ БАП, 2,69 мкМ НУК и 1,14 мкМ ИУК , затем перед этапом укоренения среда с половинной концентрацией макро- и микросолей, без БАП и дополненная 2,9 мкМ ГК. Условия культивирования: интенсивность освещения 2-3 клк, температура 23-25°С, 16-часовой фотопериод, относительная влажность воздуха 70%

↓

Укоренение микророзеток *in vitro*
Питательная среда В, содержащая макро- и микросоли в половиной концентрации, дополенная 4,90 мкМ ИМК. Условия культивирования: интенсивность освещения 2-3 клк, температура 23-25°С, 16-часовой фотопериод, относительная влажность воздуха 70%

↓

Адаптация растений к условиям *in vivo*
Пересадка полученных растений в пластиковые вазоны диаметром 8-9 см с адаптационным субстратом из торфа и перлита в соотношении 2:1 при pH 5,5. Условия культивирования: интенсивность освещения 3-4 клк, температура 23-25°С, 16-часовой фотопериод, относительная влажность воздуха вначале 80-90%, затем 70%

Рис. 30 Биотехнологическая схема клонального микроразмножения *B. riger elatior*
Fig. 30 Biotechnological scheme of clonal micropropagation *B. riger elatior*

Отбор первичных эксплантов для введения в условия *in vitro*
Оптимальный возраст растения-донора – 2-3 года. Частота регенерации микророзеток в зависимости от генотипа составляет 90-96%

↓

Введение листовых эксплантов в условия *in vitro*
Стерилизация растительного материала в 1%-ном растворе Thimerosal (15-20 мин), в 70%-ном растворе этанола (1 мин) и 0,08%-ном растворе нитрата серебра (5 мин). Частота регенерации микророзеток – 75-94%

↓

Вычленение эксплантов, введение их в условия *in vitro*, прямой органогенез и регенерация растений
Первичный эксплант: высечка листа размером 1x1 см, помещённая на питательную среду адаксиально и абаксиально. Модифицированная питательная среда МС, содержащая макро- и микроэлементы в половинной концентрации с 2,22 мкМ БАП и 0,27-1,07 мкМ НУК. Условия культивирования: отсутствие освещения, 25°С, относительная влажность воздуха 70%

↓

Собственно микроразмножение
Модифицированная питательная среда ½ МС с 1,07 мкМ НУК и 0, 44 мкМ БАП. Коэффициент размножения – 1:7-1:12. Интенсивность освещения 2-3 клк, 24°С, 16-часовой фотопериод, относительная влажность воздуха 70%

↓

Введение высечек листа ювенильных растений, полученных в условиях *in vitro*
Безгормональная питательная среда ½ МС. Условия культивирования: интенсивность освещения 2-3 клк, температура 24°С, 16-часовой фотопериод, относительная влажность воздуха 70%

↓

Укоренение микропобегов *in vitro*
Безгормональная питательная среда ½ МС. Условия культивирования: интенсивность освещения 4-5 клк, температура 24°С, 16-часовой фотопериод, относительная влажность воздуха 70%

↓

Адаптация растений к условиям *in vivo*
Пересадка растений в пластиковые вазоны диаметром 8-9 см с субстратом из «микропарника» и перлита в соотношении 1:1. Интенсивность освещения 3-4 клк, температура 24°С, 16-часовой фотопериод, относительная влажность воздуха 80-90%

Рис. 31 Биотехнологическая схема клонального микроразмножения *S. ionantha*
Fig. 31 Biotechnological scheme of clonal micropropagation *S. ionantha*

Отбор первичных эксплантов для введения в условия *in vitro*
Отбор листьев с мая по сентябрь. Частота регенерации микропобегов с мая по июнь составляет 85-100%, в остальные месяцы – не выше 50%

↓

Введение листовых эксплантов в условия *in vitro*
Стерилизация растительного материала в 1,8%-ном растворе гипохлорита натрия (5 мин) и 70%-ном растворе этанола (1 мин)

↓

Вычленение эксплантов, введение их в условия *in vitro*
Первичный эксплант: высечка листа размером 1x1 см и сегмент соцветия длиной 12 мм. Высечки листа помещают на поверхность питательной среды абаксиально и адаксиально

↓

Прямая и непрямая регенерация микропобегов в условиях *in vitro*
Первичный эксплант: высечка листа размером 1x1 см. Модифицированная питательная среда МС, содержащая 2,22 мкМ БАП и 2,69 мкМ НУК. Условия культивирования: интенсивность освещения 2-3 клк, температура 24°С, 16-часовой фотопериод, относительная влажность воздуха 70%

↓

Соматический эмбриогенез
Первичный эксплант: высечка листа размером 1x1 см. Модифицированная питательная среда МС, содержащая 2,32-3,25 мкМ кинетина и 5,37 мкМ НУК. Условия культивирования: отсутствие освещения (2 недели), температура 25°С, относительная влажность воздуха 70%

↓

Укоренение микропобегов *in vitro*
Питательная среда ½ МС, дополненная 0,98-2,46 мкМ ИМК. Условия культивирования: интенсивность освещения 2-3 клк, температура 24°С, 16-часовой фотопериод, относительная влажность воздуха 70%

↓

Адаптация растений к условиям *in vivo*
Высадка укоренённых микропобегов в пластиковые вазоны или контейнеры с адаптационным субстратом торф:песок (3:1). Условия культивирования: интенсивность освещения 3-4 клк, температура 24°С, 16-часовой фотопериод, относительная влажность воздуха на начальном этапе 80-90%, затем – 70%

Рис. 32 Биотехнологическая схема клонального микроразмножения *C. hortulanum*
Fig. 32 Biotechnological scheme of clonal micropropagation *C. hortulanum*

соцветий *B. riger elatior* осуществляется при температуре 23-25°С, 16-часовом фотопериоде и интенсивности освещения 2-3 клк. Активно развиваются в культуре *in vitro* сорта *B. riger elatior* с красными немахровыми цветками, и значительно сложнее – сорта с полумахровыми и махровыми красными, розовыми и сиренево-розовыми цветками.

Результаты проведенных исследований показали возможность индукции побегообразования в культуре высечек листа изучаемых сортов *S. ionantha*. Регенерация растений происходит без этапа каллусогенеза. Выявлен высокий морфогенетический потенциал листовых эксплантов при культивировании на модифицированной питательной среде S 1, дополненной 2,22 мкМ БАП и 0,54 мкМ НУК. Показана возможность индукции множественного побегообразования на безгормональной среде S 1 при использовании листовых эксплантов растений в культуре *in vitro*, что позволяет увеличить выход регенерантов.

Установлена зависимость частоты образования микророзеток от генотипических особенностей сорта. Листовые экспланты сортов зеленолистных форм *S. ionantha* обладают большей регенерационной способностью по сравнению с пестролистными. Пестролистность сохраняется при клональном микроразмножении в случае наличия у исходных листовых эксплантов 45-50% хлорофильных участков. Микророзетки регенериуют в основном в участках высечек листа с зеленой окраской.

Модифицированы питательные среды и установлены эффективные концентрации регуляторов роста, индуцирующие морфогенез *in vitro* в культуре листовых эксплантов *C. hortulanum*. Определены зоны листовых пластинок, способные к соматическому эмбриогенезу и органогенезу. На стадии индукции развития соматических зародышей и прямого и непрямого органогенеза в питательные среды добавляют 2,32-3,25 мкМ кинетина и 5,37 мкМ НУК, 2,22-2,66 мкМ БАП и 2,69 мкМ НУК. Оптимальные условия культивирования – температура 23-25°С, интенсивность освещения 2-3 клк и 16-часовой фотопериод.

Показано, что активное образование корней у микророзеток *B. riger elatior* происходит на среде С, содержащей макроэлементы по Кнопу, микроэлементы по Буржен -Ничу, в присутствии 4,90 мкМ ИМК. Частота укоренения достигает 100%. При этом количество корней составляет 4 шт. на микророзетку, а их средняя длина достигает 2,5 см. Введение в питательную среду ИУК и НУК вместо ИМК вызывает образование каллуса в основании микророзеток, который препятствует закладке корней.

Установлено, что 2,46 мкМ ИМК в питательной среде Cl 3 с ½ нормы солей по МС стимулирует ризогенез в среднем у 98,9% микропобегов и микророзеток *C. hortulanum*. Количество корней на микропобег в среднем составяет 4 шт., а их длина достигает 6,5 см. Совместное применение ИМК и ИУК, а также ИМК и НУК оказалось менее эффективным в процессе корнеобразования.

Укоренение микророзеток *S. ionantha* осуществляется на безгормональной питательной среде S 3, состоящей из ½ нормы солей МС, витаминов по МС и 20 г/л сахарозы. Частота укоренения достигает 91-98% у зеленолистных форм и 73-88% – у пестролистных. Среднее количество корней на побег у зеленолистных *S. ionantha* составляет 5-6 штук длиной 1,8-2,0 см, у пестролистных – 4-5 штук длиной 1,5-2,0 см.

Список литературы

1. *Бутенко Р.Г.* Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе : учеб. пособие. – М.: УБК-Пресс, 1999. – 160 с.

2. *Бутенко Р.Г., Яковлева З.М.* Контролируемый органогенез и регенерация целого растения в культуре недифференцированной ткани // Изв. АН СССР. Сер. Б. – 1962. – № 2. – С. 230–241.

3. *Высоцкий В.А., Герасимова Н.В.* Клональное микроразмножение в системе производства посадочного материала малины // Ягодоводство в Нечерноземье. – М., 1989. – С. 65–74.

4. *Высоцкий В.А.* Клональное микроразмножение растений и биотехнология / под ред. Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1986. – 360 с.

5. *Иванова Н.Н.* Клональное микроразмножение *Paeonia suffruticosa* Andr. // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова. – К.: Логос, 2006. – Т. 3. – С. 565 – 570.

6. *Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В.* Технология микроклонального размножения растений. – К.: Наукова думка, 1992. – 232 с.

7. *Катаева Н.В., Бутенко Р.Г.* Клональное микроразмножение растений. – М.: Наука, 1983. – 96 с.

8. *Котовщикова Н.И.* К вопросу культивирования сенполий (биология и экология) // Труды Никит. ботан. сада. – 1976. – Т. 68. – С. 98–107.

9. *Кунах В.А.* Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.

10. *Методические рекомендации* по получению безвирусного посадочного материала гвоздики садовой группы «СИМ» / сост. Митрофанова О.В., Кудрявцев И.П., Ильницкий О.А., Шестаченко Г.Н., Сморжевская Н.П. – Симферополь: /б.и./, 1980. – 25 с.

11. *Митрофанова И.В.* Соматический эмбриогенез и органогенез как основа получения и сохранения многолетних садовых культур. – К.: «Аграрная наука», 2011. – 344 с.

12. *Митрофанова О.В.* Вирусные болезни промышленных цветочных культур и биотехнологические приемы оздоровления. – М., 1992. – 206 с. – Деп. в ВИИТИ, № 1729–В92.

13. *Митрофанова О.В, Митрофанова И.В, Смыков А.В, Лесникова Н.П.* Методы биотехнологии в селекции и размножении субтропических и косточковых плодовых культур // Интенсификация селекции плодовых культур: Труды Никит. ботан. сада. – 1999. – Т. 118. – С. 189–200.

14. *Митрофанова О.В., Зленко И.Л., Митрофанова И.В., Иванова Н.Н.* Об условиях пролиферации протокормов цимбидиума // Бюлл. Никит. ботан. сада. – 1990. – Вып. 72. – С. 105–111.

15. *Митрофанова О.В., Иванова Н.Н.* Получение безвирусных клонов луковичных цветочных культур // Бюлл. Гос. Никит. ботан. сада. – 1987. – Вып. 62 – С. 37–41.

16. *Пат. на винахід* 68595 Україна, МПК 7 А01Н 4/00. Спосіб регенерації адвентивних мікропагонів *Hyssopus officinalis* L. в умовах *in vitro*: Митрофанова І.В., Іванова Н.М., Митрофанова О.В. (Україна). – № 2003087613; Заявлено 12.08.2003 р.; Надрук. 15.06.2006 р., Бюл. 6.

17. *Фролова Л.В.* Особенности популяции культивируемых клеток // Культура клеток растений. – М.: Наука, 1981. – С. 5–16.

18. *Черевченко Т.М., Лаврентьева А.Н., Иванников Р.В.* Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro*. – К.: Наукова думка, 2008. – 559 с.

19. *Чуб В., Лезина К.* Все о комнатных растениях. – М.: ЭКСМО-Пресс, 2002. – 336 с.

20. *Шахова Г.И.* Бегониевые. – М.: Планета, 1987. – Сер. Комнатные растения, Вып. 3. – 60 с.

21. *Basal S.K.* Ornamental Plant sand Biotechnology. – Iaipur: Book Enclave, 2007. – VIII. – 308 p.

22. *Brand M.H., Kiyamoto R.* The induction of tissue proliferation like characteristics in *in vitro* cultures of *Rhododendron* «Monteg» // Hort Science. – 1997. – Vol. 32, N 6. – P. 989–994.

23. *Daykin M., Langhans R.W., Earle E.D.* Tissue culture of the clouble petunia // Hortic. Science. – 1976. – Vol. 11. – P. 35.

24. *Dittmer C., Oertel C.* Der Aufbau virusfreier Pelargonien durch Meristemkultur, Wärmebehandlung und Virusverlust // Tag.–Ber. Akad. Landwirsch. – Berlin: Wiss. DDR. – 1980. – N 184. – S. 425–430.

25. *Duan J.X., Yasawa S.* 6-Bensyladenine and low night temperature treatments induce early flowering in young *Phalaenopsis* seedings // Jap. J.Trop.Agricult. – 1994. – Vol. 38. – P. 60 – 76.

26. *Fonnesbech A., Fonnesbech M. In vitro* propagation of *Monstera deliciosa* // Hort Science. – 1980. – Vol. 15. – P. 740–741.

27. *Fujino M., Fujimura T., Hamada K.* Multiplication of Dutch Iris (*Iris hollandica*) by organ culture // J. Jap. Soc. Hort. Sci. – 1972. – Vol. 41, N 1. – P. 66–71.

28. *Grout B.W.W.* African violet // Handbook of plant cell culture / Eds. P.V. Ammirato, D.A. Evans, W.R. Sharp, Y.P.S. Bajaj. – New York: MacGraw–Hill Publ. Co., 1990. – Vol. 5. – P. 181–205.

29. *Han K.H., Park Y.G.* Somatic embryogenesis in black locust (*Robinia pseudoacacia* L.) // Somatic Embryogenesis in Woody Plants / Eds. S.M. Jain, P.K. Gupta, R.J. Newton. – Great Britain : Dordrecht : Kluwer Acad. Publishers, 1999. – Vol. 5. – P. 149–161.

30. *Heller R.* Recherches sur la nutrition minerale des tissue vegetaux cultives *in vitro* // Ann. Sci. Nat. – Biol. Vegetale. – 1953. – Vol. 14. – P. 1 – 223.

31. *Horn W., Kintz H., Meier K.* Der Einfluss verschiedenartiger Leuchtlampen auf die *in vitro* Organogenesis von Kalanchoe – Hybriden // Gartenbauwissenschaft. – 1988. – Bd. 53, N 3. – S. 103 – 110.

32. *Hradilik J., Fišerova H.* Explantátová kultivace frezii a rhododendronu // Acta universitatis Agriculturae. – 1988. – Vol. 36, N 1. – P. 29–37.

33. *Huang Li-Chun, Liu Din-Ming.* Clonal multiplication of *Lykoris aurea* by tissue culture // Sci. Hort. (Neth.). – 1989. – Vol. 40, N 2. – P. 145 – 152.

34. *Hussey G.* Propagation of hyacinths by tissue culture // Sci. Hort. – 1975. – Vol. 3, N 1. – P. 21–28.

35. *Jain S.M., Brar D.S., Ahloowalia B.S.* Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. – Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Acad. Publ., 1998. – P. 603.

36. *Kintzios S., Manos S., Makri O*. Somatic embryogenesis from mature leaves of rose (*Rosa* sps) // Plant Cell Rep. – 1999. – Vol. 18, N 6. – P. 467–472.

37. *Knop W.* Quantitative Untersuchungen uber di Ernarungsprocess der Pflanzen // Land.Vers. Sta. – 1865. – Vol. 7. – P. 93.

38. *Kumar A., Sood A., Palni V.T., Gupta A.K., Palni L.M.* Micropropagation of *Rosa damascena* Mill. from mature bushes using thidiazuron // J Hortic Sci Biotech. – 2001. – Vol. 76. – P. 30–34.

39. *Kunisaki J.T. In vitro* propagation of *Anthurium andreanum* Lind. // Hort Science. – 1980. – Vol. 15, N 4. – P. 508–509.

40. *Litz R.E., Jarret R.L., Asokan H.P.* Tropical and subtropical fruits and vegetables // Tissue culture as a plant production system for Horticultural crops / Eds. R.H. Zimmerman, F.A. Griesbach, F.A. Hammerschlag, R.H. Lawson. – Nijhoff: Dordrecht; Netherlands, 1986. – P. 237 – 251.

41. *Mathews V. Helena, Rao P.S. In vitro* culture of *Vanda* hybrid (*Vanda* TMA x *Vanda* Miss Joaguim) // Proc. Indian Nat. Sci. Acad. – 1985. – Vol. 51, N 4. – P. 496 – 504.

42. *Mikkelsen E.P., Sink K.C. In vitro* propagation of rieger Elatior Begonias // Hort Science. – 1978. – Vol. 13. – P. 242–244.

43. *Morel G.M.* La culture *in vitro* du meristeme apical de certaines Orchidees // C. r. Acad. Sci. – 1963. – Vol. 235, N 23. – P. 4955 – 4957.

44. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays tobacco tissue culture // Physiol. Plant. –1962. – Vol. 15, N 3. – P.473–497.

45. *Murashige T.* Manipulation of organ culture in plant tissue cultures // Botanical Bulletin Academia Sinica. – 1977. – Vol. 18. – P. 1–24.

46. *Murch S.J., Victor J.M.R., Saxena P.K.* Auxin, calcium and sodium in somatic embryogenesis of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) cv. Benjamin // Acta Hortic. – 2003. – N 625. – P. 201–209.

47. *Noriega C., Sondahl M.R.* Somatic embryogenesis in hybrid tea roses // Biotechnology. – 1991. – Vol. 9. – P. 991–993.

48. *Oliviera M.M., Pais M.S.S.* Somatic embryogenesis in leaves and leaf-derived protoplasts of *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* cv. Hayward (kiwifruit) // Plant Cell Rep. – 1992. – Vol. 11. – P. 314-315.

49. *Pierik R.L.M. Anthurium andreanum* plantlets produced from callus tissues cultivated *in vitro* // Physiol. Plant. – 1976. – Vol. 37, N 1. – P.80–82.

50. *Pierik R.L.M., Steegmans H.H.M.* Effect of auxins, cytokinins, gibberellins, abscisic acid and ethephon of hyacinth // Physiologia Plantarum. – 1975. – Vol. 34. – P. 14–17.

51. *Pierik R.L.M., Tetteroo T.A.A.* Vegetative propagation of *Begonia venosa* Skan *in vitro* from inflorescence explants // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1987. – N 10. – P. 135–142.

52. *Qureshi I.A., Saxena P.K.* Adventitious shoot inductions and somatic embryogenesis with intact seedlings of several hybrid seed geranium (*Pelargonium* x *hortorum* Bailey.) varieties // Plant Cell Rep. – 1992. – Vol. 11, N 9. – P. 443–448.

53. *Reuter G., Bhandari N.N.* Organogenesis and histogenesis of adventitious organs induced on leaf blade segments of *Begonia elatior* hybrids (*Begonia hiemalis*) in tissue culture // Gartenbauwissenschaft. – 1981. – Bd. 46. – S. 241–249.

54. *Roest S., Bokelmann G.S.* Vegetative propagation of *Chrysanthemum cinerariaefolium in vitro* // Sci. Hortic. – 1973. – Vol. 1. – P. 120–122.

55. *Rout G.R., Jain S.M.* Micropropagation of ornamental plants–cut flowers // Prop. Ornamental Plants. – 2004. – Vol. 4, N 2 – P. 3–28.

56. *Samyn G., Van Bockstaele E.* Regeneration in explants of several azalea (*Rhododendron simsii*) cultivars // Developmental Biology of Regeneration: Abstracts 1st Meeting COST 843, WG 1 (12–15 October 2000, Geisenheim, Germany). – Geisenheim, 2000. – P. 17–18.

57. *Sharma A.K., Mitra G.C. In vitro* culture of shoot apical meristem of *Petunia hybrida* for mass production of plants // Indian J. Exp. Biol. – 1976. – Vol. 14. – P. 348–350.

58. *Shibata M.* Importance of genetic transformation in ornamental plant breeding // Plant Biotechnology. – 2008. – N 25. – P. 3–8.

59. *Simmonds J., Werry T.* Liquid shake cultures for improved micropropagation of *Begonia hiemalis* // Hortic Sci. – 1987. Vol. 22. – P. 122 – 127.

60. *Skoog F., Miller C.O.* Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro* // The biological action of growth substances: Symp. Soc. Exp. Biol. – Cambridge: Univ. press, 1957. – Vol. 11. – P. 118–131.

61. *Thao N.T.P., Ozaki Y., Okubo H.* Callus induction and plantlet regeneration in ornamental *Alocasia micholitziana* // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 2003. – Vol. 73, N 3. – P. 285–289.

62. *Vazqyez A.M., Davcy M.R., Short K.C.* Organogenesis in cultures of *Saintpaulia ionantha* // Acta Hortic. – 1977. – N 78. – P. 249 – 258.

63. *Yi L., Yan P.* Plant biotechnology in ornamental horticulture. – Binghamton [ect.]: Hawort, 2006. – XIX. – 528 p.

Ivanova N.N., Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V. Methodical base of clonal micropropagation of some ornamental plants // Works of the State Nikit. Botan. Gard. – 2014. – V. 138. – P. 57-101.
The results of morphogenesis complex researches in conditions *in vitro* of explants *B. riger elatior*, *C. hortulanum*, *S. ionantha* for working out the methods of clonal micropropagation of studied cultivars have been given. Types and sizes of explants, dependence of morphogenetic capacity on genotype have been determined. The peculiarities of hormon regulation of morphogenesis have been established and optimal concentrations of growht regulators for stages of induction of explant development, microshoots regeneration and their rooting have been choosen.

Key words *B. riger elatior*, *C. hortulanum*, *S. ionantha*, *morphogenesis*, *regeneration*, *rhyzogenesis*, *adaptation*.