

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НИКИТСКИЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД

---

**МЕТОДОЛОГИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И  
ВИРУСОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ  
ЦЕННЫХ МНОГОЛЕТНИХ КУЛЬТУР**



**Сборник научных трудов ГНБС  
Том 138**

---

Ялта 2014

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НИКИТСКИЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД

---

---

**МЕТОДОЛОГИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И  
ВИРУСОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ  
ЦЕННЫХ МНОГОЛЕТНИХ КУЛЬТУР**

Сборник научных трудов ГНБС  
Том 138

**Под общей редакцией  
доктора биологических наук, проф. О.В. Митрофановой,  
доктора биологических наук И.В. Митрофановой**

---

---

Ялта 2014

В сборнике приведены результаты многолетних исследований в области биотехнологии и вирусологии ценных многолетних растений, которые представлены как методологии изучения конкретных процессов развития растений *in vitro*, получения безвирусного посадочного материала, диагностики вирусных болезней и оценки их распространения.

Для ученых и специалистов в области ботаники, биотехнологии, вирусологии, селекции, физиологии растений и экологии, преподавателей и студентов профильных кафедр и факультетов высших учебных заведений.

Печатается по постановлению Учёного совета НБС, протокол от 14.11.2014 г. № 15

**Редакционно–издательский совет:**

Плугатарь Ю.В. – главный редактор, Багрикова Н.А, Балыкина Е.Б., Ильницкий О.А., Исиков В.П., Клименко З.К., Коба В.П., Корженевский В.В., Маслов И.И., Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Опанасенко Н.Е., Работягов В.Д., Смыков А.В., Шевченко С. В., Шишкин В.А. – ответственный секретарь, Ярош А.М. – зам. главного редактора, Ярмишко В.Т., Ташев Александр (Болгария), Салаш Петр (Чешская республика)

**THE STATE NIKITSKY BOTANICAL GARDENS**

---

**METHODOLOGY OF BIOTECHNOLOGICAL AND  
VIROLOGICAL INVESTIGATIONS OF VALUABLE  
PERENNIAL PLANTS**

**WORKS OF THE STATE NIKITSKY BOTANICAL GARDENS**  
Volume 138

**Edited by**  
**Doctor of Biology Science, Professor O.V. Mitrofanova**  
**Doctor of Biology Science I.V. Mitrofanova**

---

**Yalta 2014**

The book has been shown the results of long-term research in the field of Biotechnology and Virology of valuable perennial plants, which are presented as a methodology for the study of specific processes of *in vitro* plant development, producing virus-free planting material, diagnostics of viral diseases and assess their distribution.

For scientists and experts in the field of Botany, Biotechnology, Virology, Breeding, Plant Physiology and Ecology, teachers and students of professional departments and faculties at higher educational institutions and universities.

**Editorial–Publishing Board:**

Plugatar Yu.V. – chief editor, Bagrikova N.A., Balykina E.B., Ilnitsky O.A., Isikov V.P., Klimenko Z.K., Koba V.P., Korzhenevsky V.V., Maslov I.I., Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Opanasenko N.E., Rabotyagov V.D., Smykov A.V., Shevchenko S.V., Shishkin V.A. – responsible secretary, Yarosh A.M. – deputy chief editor, Yarmyshko V.T., Tashev Alexander (Bulgaria), Salash Peter (Cheshskaya Republic)

УДК 635.9:58.083:57.085.2

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

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

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

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

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

### Введение

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

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

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

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

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

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

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

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

#### Объекты и методы исследования

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

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

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

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

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

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

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

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

### Результаты и обсуждение

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



Рис. 1 Модель системы освобождения растений от вирусов  
Fig. 1 Model system of plants improvement from viruses

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

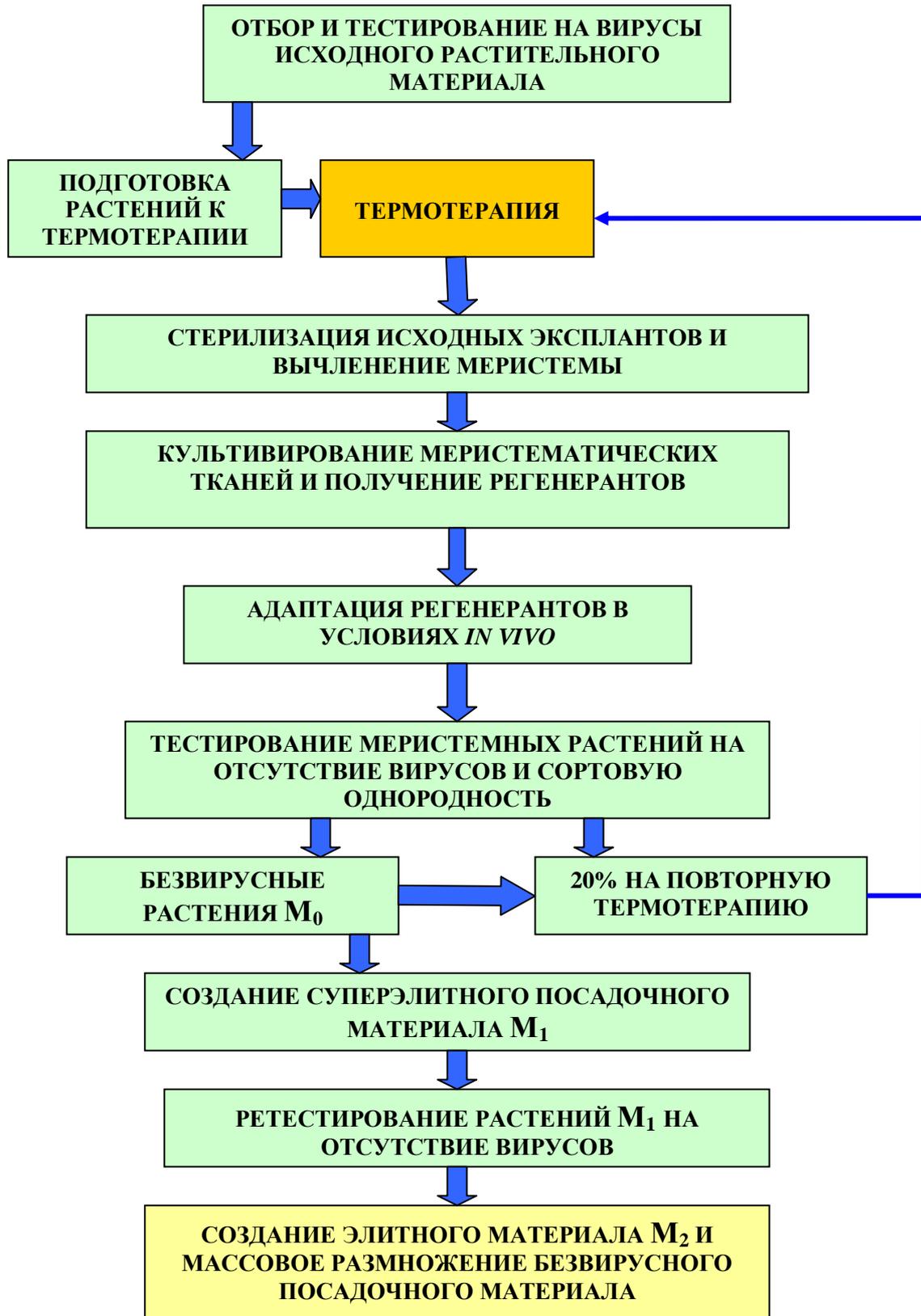


Рис. 3 Биотехнологическая схема получения безвирусного посадочного материала хризантемы  
Fig. 3 Biotechnological scheme for obtaining of *Chrysanthemum* virus-free planting material



**Рис. 4** Термопатия растений хризантемы  
**Fig. 4** Thermotherapy of Chrysanthemum plants

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Продолжение таблицы 1

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

### Культивирование меристематических тканей и получение регенерантов.

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ниже описывается содержание этапов биотехнологии:

Подготовка растений к термотерапии;

Термотерапия;

Стерилизация эксплантов и вычленение меристемы;

Питательные среды;

Культивирование меристематической ткани, получение микропобегов и регенерантов;

Адаптация регенерантов;

Ретестирование меристемных растений на отсутствие вирусов и сортовую однородность;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Таблица 2**

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

**Table 2**

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

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

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

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

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

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

Таблица 3

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

Table 3

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

	Компоненты	К-во вещества, г/40 л
А.	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	66,0
Б.	$\text{KNO}_3$	76,0
В.	$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,248
	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	6,8
	КJ	0,033
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,007
Г.	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,001
Д.	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	17,6
Е.	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	14,8
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,892
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,344
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,001
Ж.	$\text{Na}_2\text{EDTA}$	1,42
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,114
З.	Аденинсульфат	1,6
	Са-пантотенат	0,04
	Биотин	0,04
И.	Глицин (гликокол)	0,8
	Никотиновая кислота (витамин В <sub>3</sub> )	0,04
	Пиридоксин·HCl (витамин В <sub>6</sub> )	0,04
	Тиамин·HCl (витамин В <sub>1</sub> )	0,04

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

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

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

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

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

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

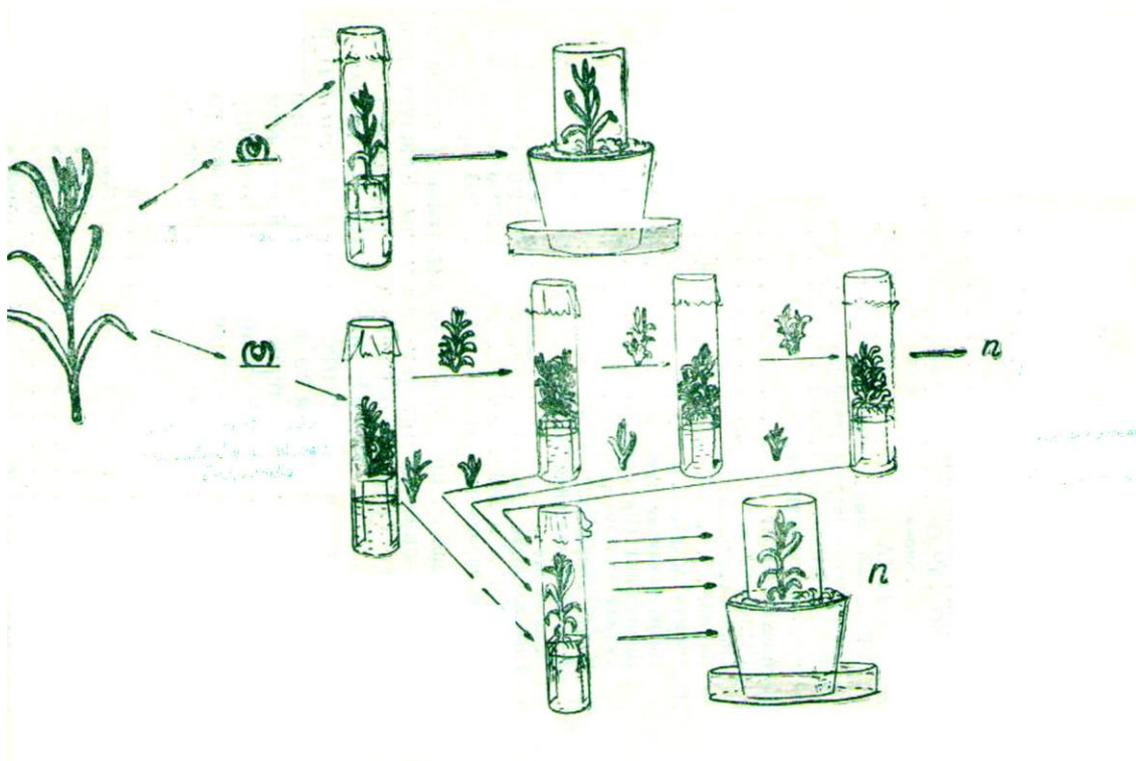


Рис. 6 Биотехнологическая схема массового размножения безвирусных растений гвоздики ремонтантной

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

Электронномикроскопический метод применяют для быстрого и прямого обнаружения вирусных частиц.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Биотехнология включает следующие этапы:

Отбор и тестирование исходного материала на отсутствие вирусов;

Питательные среды;

Стерилизация растительного материала, вычленение меристемы и получение регенерантов;

Термо- и хемотерапия;

Условия культивирования меристематических тканей, протоколов и регенерантов;

Адаптация регенерантов *in vivo*;

Ретестирование меристемных растений и их репродукций на отсутствие вирусов;

Создание суперэлитных маточных посадок.

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

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

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

**Таблица 4**

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

**Table 4**

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

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

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

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

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

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

Таблица 5

Составы питательных сред для культивирования цимбидиума

Table 5

Compounds of culture media for *Cymbidium hybridum* cultivation

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

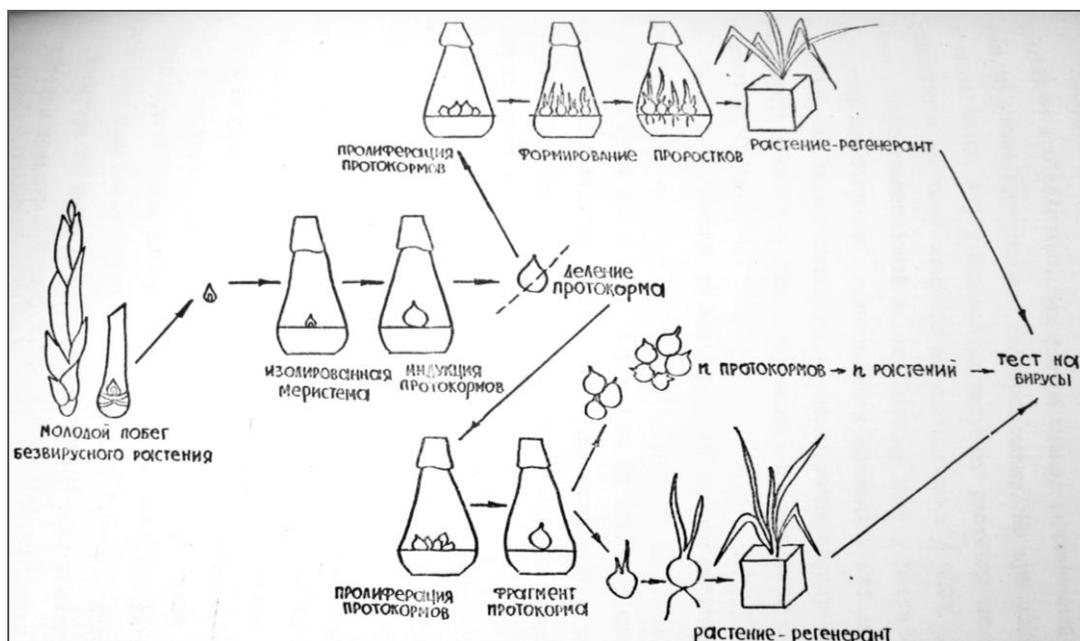


Рис. 8 Биотехнологическая схема клонального микроразмножения цимбидиума  
Fig. 8 Biotechnological scheme of *Cymbidium hybridum* clonal micropropagation

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

Этапы биотехнологии (рис. 12):

Тестирование и отбор безвирусных растений;

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



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



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

Приготовление питательных сред ;

Условия культивирования эксплантов, индукция и пролиферация каллуса;

Регенерация микропобегов и растений *in vitro*;

Адаптация регенерантов *in vivo*;

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

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

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

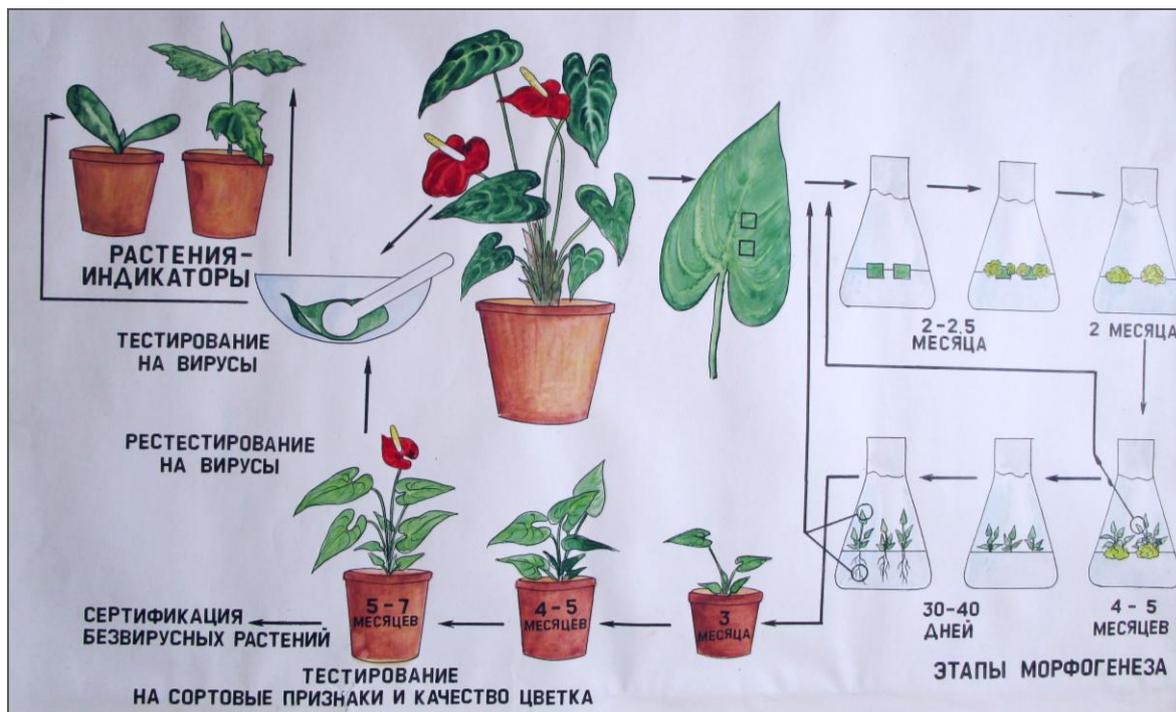


Рис. 12 Биотехнологическая схема получения и клонального микроразмножения безвирусного посадочного материала *Anthurium andreanum*

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

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

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

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

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

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

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

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

Таблица 6

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

Table 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

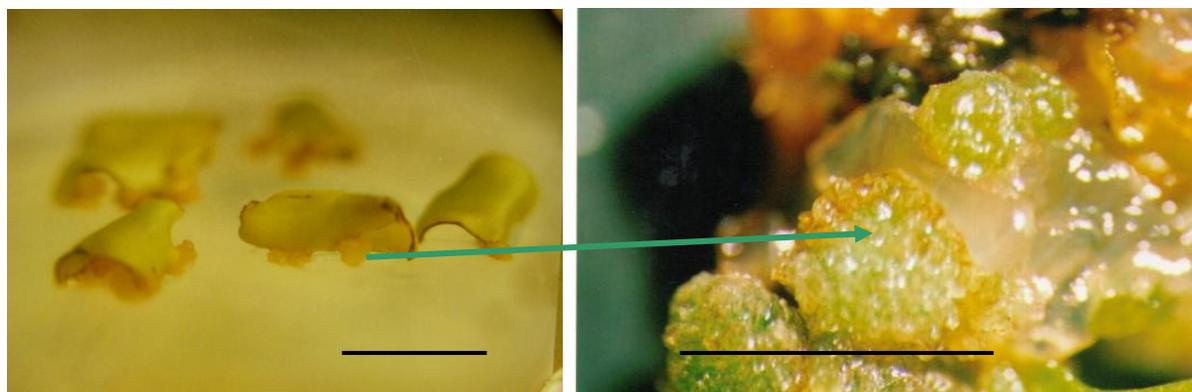
хранении среда начинает «портиться», происходит разложение физиологически активных веществ и подсыхание. Перед использованием питательной среды, хранившейся в холодильной камере, штативы вынимают заранее, чтобы температура сравнялась с температурой окружающей среды.

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

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

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

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



а (a)

б (b)

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

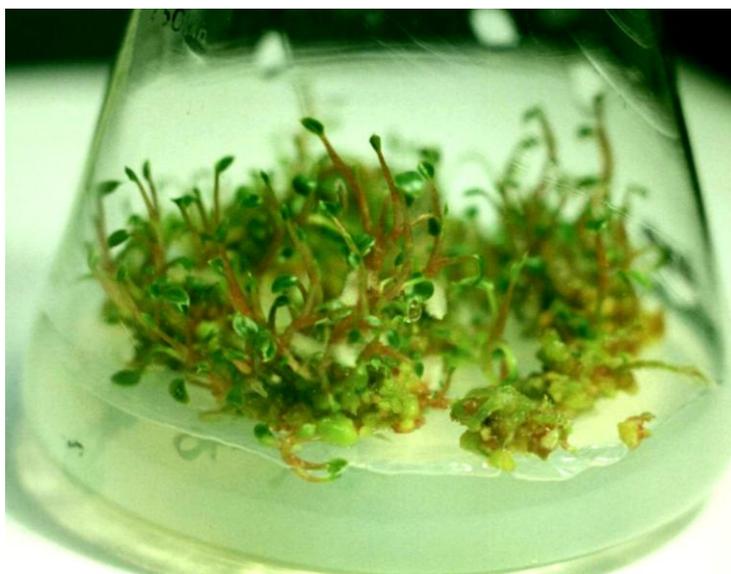
**Fig. 13** Callusogenesis in leaf culture of *Anthurium andreanum*: а) callus formation at margin of leaf cutting; б) callus (Bar 1 cm)

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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



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

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



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

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

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

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



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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

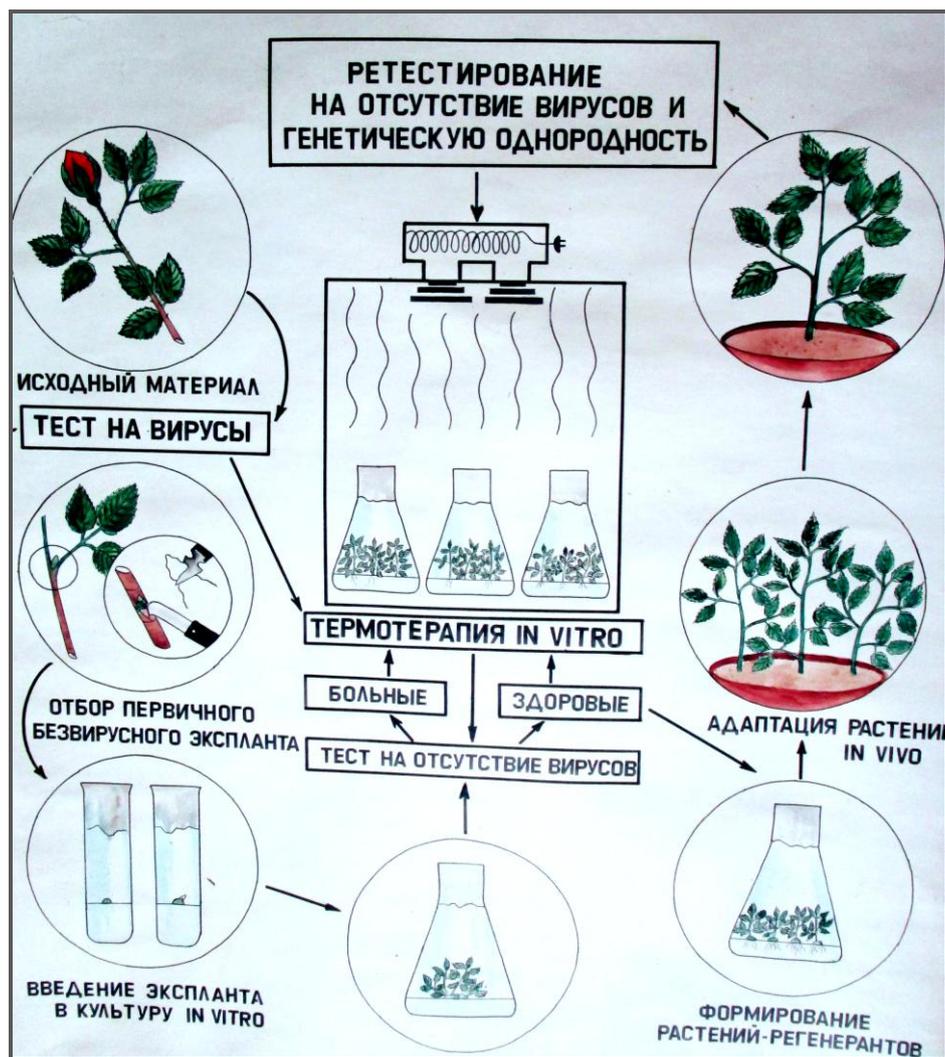


Рис. 19 Биотехнологическая схема оздоровления и клонального микроразмножения розы садовой  
 Fig. 19 Biotechnology scheme of improvement and clonal micropropagation of *Rosa sp.*

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

Таблица 8

Составы питательных сред для клонального микроразмножения розы, мг/л

Table 8

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

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

Продолжение таблицы 8

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

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

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

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

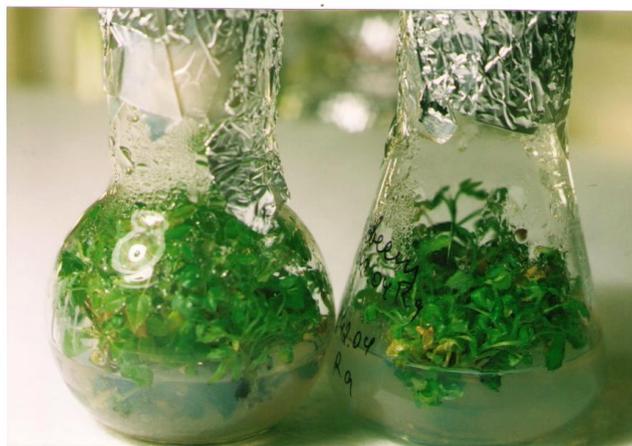


Рис. 20 Массовое побегообразование розы садовой *in vitro*  
Fig. 20 Mass shoot formation of *Rosa sp. in vitro*

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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



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

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

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

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



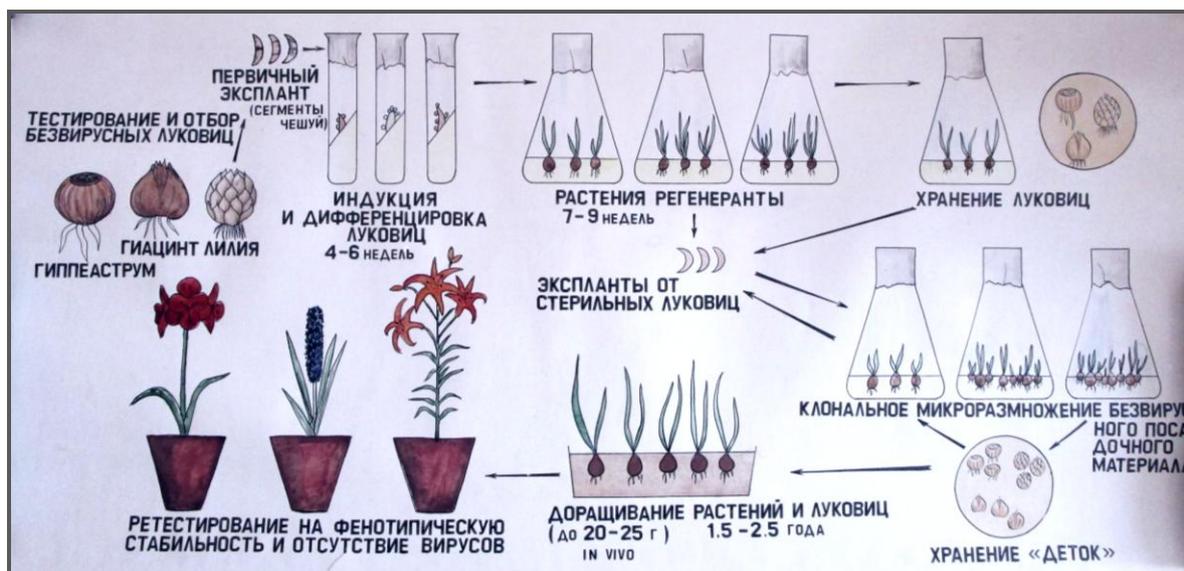
Рис. 23 Цветущие растения розы  
 Fig. 23 Flowering *Rosa sp.* plants

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Таблица 9

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

Table 9

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

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

Продолжение таблицы 9

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

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

Таблица 10

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

Table 10

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

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

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

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

Таблица 11

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

Table 11

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### Выводы

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

### Список литературы

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

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

23. Петерсон Л., Жола И., Донде Д. Размножение гвоздик с помощью культуры меристем для получения безвирусного исходного материала // Тр. Ин-та Латв. СХА. – 1974. – Вып. 82. – С. 53-57.

24. Попов Ю.Г. Культура *in vitro* меристематических верхушек стебля как метод оздоровления и размножения растений // Биологические науки. – 1976. – № 6. – С. 13-24.

25. Проценко А.Е. Электронномикроскопическое изучение фитопатогенных вирусов // Микробиология. – 1953. – Т. 22. – Вып. 6. – С. 709-713.

26. Тесленко А.В., Митрофанова О.В., Лукичева Л.А. Разработка технологии получения безвирусного материала персика // Сб. науч. Тр. Никит. ботан. сада. – 1986. – Т. 99. – С. 85-92.

27. Уоринг Ф., Филиппс И. Рост растений и дифференцировка: Пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – 512 с.

28. Цуркан И.Г. Термическая терапия плодовых, ягодных культур и винограда, пораженных вирусами. Кишинев: Картя Молдовеняскэ, 1973. – Вып. 11. – С. 68-124.

29. Харченко Л.Т. Получение растений картофеля, свободных от вирусной инфекции // Культура изолированных органов, тканей и клеток растений. – М.: Наука, 1970. С. 320-323.

30. Черевченко Т.М., Кушнир Г.П. Биология и размножение антуриума Андрэ в закрытом грунте // Докл. АН УССР, сер. Б. – 1981. С. 83-86.

31. Baker K.K., Ramsdell D.C., Gillett J.V. Electron microscopy: current applications to plant virology/ - Plant Diseases. – 1985. – Vol. 69. – P. 85-90.

32. Barnett O.W., Gibson P.B., Seo A. A comparison of heat treatment, cold treatment and meristem tip-culture for obtaining virus-free plants of *Trifolium repens* // Plant Dis. Rep. – 1975. – Vol. 59. – P. 834-837.

33. Biotechnology of Ornamental Plants / Eds. R.L. Geneve, J.E. Preece, S.A. Merkle. – Wallingford: CAB International, 1997. – 412 p.

34. Buys C., Poortmans P., Rudelle M. Serienmasige Meristemkulturen und Auswahl virusfreier Nelken im Grossen // Gartenwelt. – 1966. – Bd. 14. – S. 305-307.

35. Clark M.F., Adams A.N. Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses // Journal of General Virology. – 1977. – Vol. 34, N 3. – P. 475-483.

36. Davis D.R. Rapid propagation of roses *in vitro* // Scientia Horticulturae. – 1980. – N 13. – P. 385-389.

37. Elliott R. F. Axenic culture of meristem tips of *Rosa multiflora* // Planta. – 1970. – Vol. 95, N 2. – P. 183-186.

38. Farsi M., Taghavizadeh Yazdi M.E., Qasemimran V. Micropropagation of *Anthurium andreaeanum* cv. Terra // African J. Biotech. – 2012. – Vol. 11 (68). – P. 13162-13166.

39. Geier T., Reuther G. Vegetative vermehrung von *anthurium scherzianum* durch gewebekultur // Zierpflanzenbau. – 1981. – Bd. 21. – S. 476-477.

40. George E.F., Hall M.A., De Klerk G.-J. Plant Propagation by Tissue Culture. 3<sup>rd</sup> Edition. – Dordrecht, Netherlands: Springer, 2008. – 501 p.

41. Heller R. Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivés *in vitro* // Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. – 1953. – N 14. – P. 1-223.

42. Hollings M., Kassanis B. The curl of chrysanthemums from some virus diseases by heat // J. Roy. Hort. Soc. – 1957. – Vol. 82, N 8. – P. 339-342.

43. Holmes F.O. Elimination of foliage spotting from sweet potato // Phytopathology. – 1956. – Vol. 46. – P. 502-504.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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 тотипотентности клеток и регенерационным потенциалом. Поэтому необходим методический подход к проводимым биотехнологическим исследованиям, что позволяет разрабатывать и совершенствовать 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 проводят в 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<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, 0,08%-ный раствор нитрата серебра AgNO<sub>3</sub>, 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-бензиламинопуридин (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 22-25°C, 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 экспланта, 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 экспланта 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 экспланта; 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 экспланта 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 экспланта 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 экспланта. 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) редиференциация 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 сегментов листовых пластинок, черешков, стеблей на среде Линсмайер и Скуга, дополненной ИУК и БАП [28].

Формирование многочисленных протокормов гибрида *Vanda TMA x Vanda Miss Joaquim* 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 (*Rhododendron 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 редиференциации 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 экспланта 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 Бюуса (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 апоплярно. 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  $\mu\text{M}$  кинетина и 0,5  $\mu\text{M}$  2,4-Д получена регенерация микропобегов из каллуса черешка *Alocasia micholitziana* сорт Green Velvet [61]. Полученные микропобеги успешно укоренились на безгормональной питательной среде.

Активное побегообразование рододендрона сорта Monteg было получено на среде для древесных растений, дополненной 10-50  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  БАП и 5,7  $\mu\text{M}$  ИУК в течение 4-х недельного субкультивирования [57].

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

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

Разработан эффективный способ размножения *Rosa damascena* Mill. на среде МС, применяя в качестве цитокинина 1,0-2,5  $\mu\text{M}$  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 гибберелловая 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 рН ИУК, гибберелловая кислота, витамины. От величины рН зависит доступность для тканей фосфатов, соединений железа, солей тяжелых металлов.

Оптимальными для большинства изолированных тканей являются среды с рН 5,0-5,8 [18]. Для поддержания постоянного значения рН 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/л аденинсульфата, 1 мг/л тиамин, 0,5 мг/л пиридоксина, 5 мг/л никотиновой кислоты и 2 мг/л глицина, 30 мг/л ИУК 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* Т. 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 23-25°C. 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 эксплантов соцветий на питательной среде, дополненной 0,5 мг/л БАП и 0,5 мг/л НУК [51], культивировали при температуре 21°C. Снижение температуры до 17°C замедляло индукцию и рост каллуса, тогда как повышение до 25°C вызывало его некроз.

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

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

При выращивании теплолюбивых тропических растений температура культивирования может повышаться до 25-30°C. Так, при микроразмножении *Monstera deliciosa* Liebm. var *borsigiana* (C.Koch.) Engl. температура 30°C была более благоприятной, чем 20-25°C [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* × *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 травянистое 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 Apache Midnight – растение компактное, листья округлые, зелено-белорозовые. 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 Речное – 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 стерилизуют, 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 x 1 см и сегменты соцветий длиной 12 мм помещают на питательные среды МС и А.

**Получение стерильной культуры *S. ionantha*.** Учитывая морфобиологические особенности (опущение 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 S1 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 x 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 x 1 см из разных зон листовой пластинки помещают на модифицированную питательную среду С1 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 экспланта на поверхности питательной среды, размер исходного экспланта. Растения, полученные через этап каллусообразования, фенотипически могут существенно отличаться от исходных. Однако в ряде случаев не прямой органогенез является единственно возможным способом клонального микроразмножения многих растений. Для поддержания генетической стабильности полученных растений целесообразно использовать прямой путь регенерации, непосредственно из клеток экспланта. В этом случае на одном листовом экспланте 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 x 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 microshoots 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.

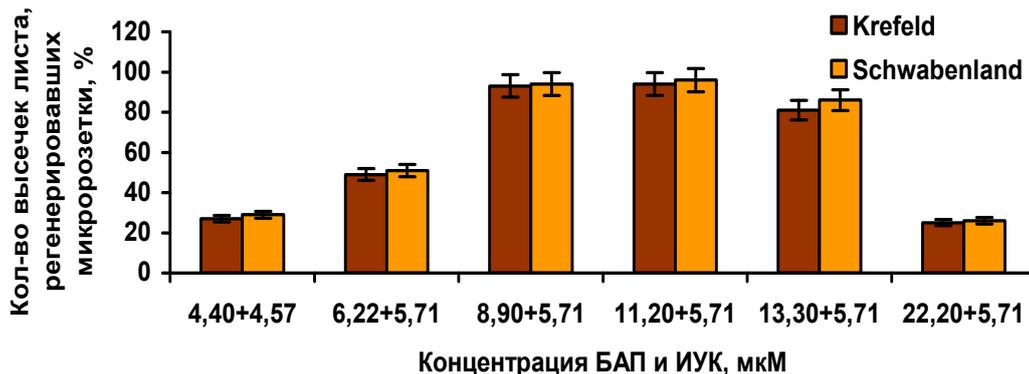


Рис. 6 Влияние концентрации БАП и ИУК на регенерацию микророзеток сортов Krefeld и Schwabenland

Fig. 6 Influence of BAP and IAA concentrations on the regeneration of microshoots 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 23-25°C, 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.

Таблица 1

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
<b>Макросоли, мг/л</b>			
KNO <sub>3</sub>	125	125	125
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	500	500	500
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	125	125	125
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	125	125	125
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	27,8
Na <sub>2</sub> ЭДТА·2H <sub>2</sub> O	37,3	37,3	37,3
<b>Микросоли, мг/л:</b>			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10	10	10
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	25	25	25
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	10	10	10
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25
<b>Витамины, мкМ:</b>			
Глицин	8,61	8,61	8,61
Тиамин-НСI	1,49	1,49	1,49
Пиридоксин-НСI	2,96	2,96	2,96
Никотиновая к-та	40,6	4,06	4,06
Мезоинозит	555,1	555,1	555,1
<b>Регуляторы роста, мкМ:</b>			
БАП	13,30	4,40	-
НУК	2,69	2,69	-
ИУК		1,14	
ИМК	-	-	4,90
ГК		2,89	
Аденин·SO <sub>4</sub>	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%.

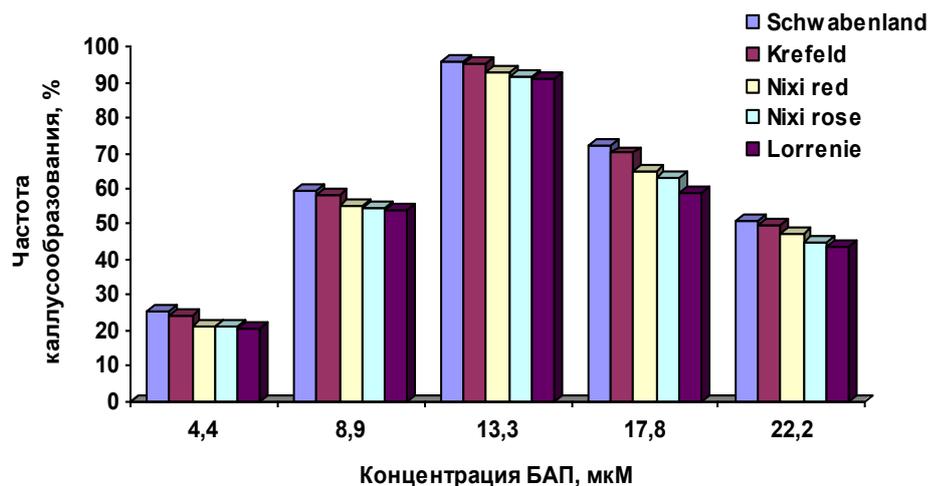


Рис. 7 Влияние БАП на индукцию каллусогенеза в культуре сегментов соцветия *B. riger elatior* в условиях *in vitro* (2,69 мкМ НУК)

Fig. 7 Influence of BAP on induction of callusogenesis in segment culture of inflorescence in *B. riger elatior in vitro* (2,69 µM NAA)

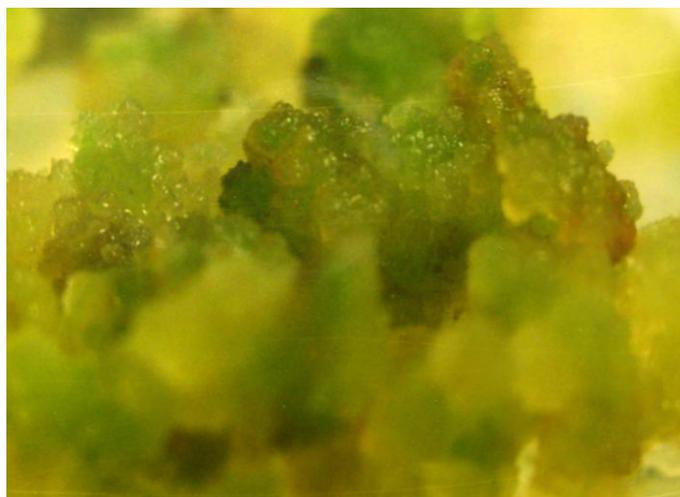


Рис. 8 Формирование морфогенного каллуса на свету в культуре сегментов соцветия *B. riger elatior* сорт Nixi red на среде А, дополненной 2,69 мкМ НУК и 13,30 мкМ БАП

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 бурю 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 экспланта, 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 пассажирами. 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).

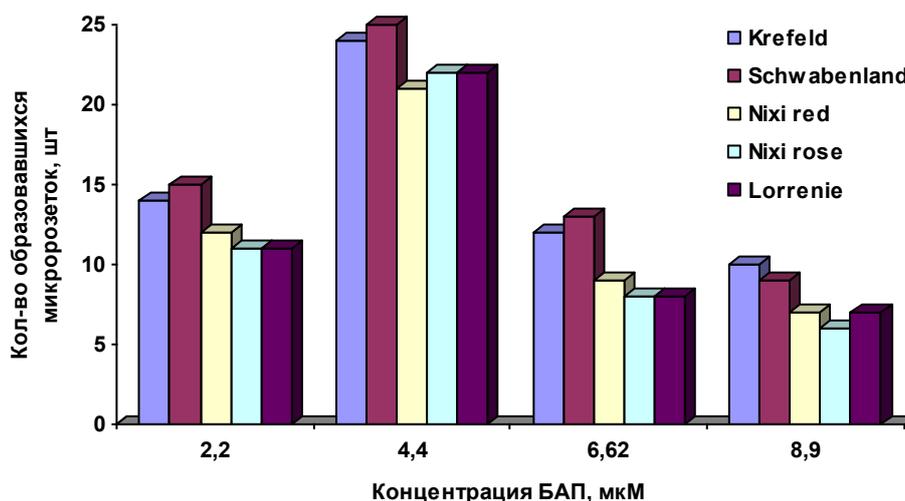


Рис. 9 Влияние концентрации БАП на регенерацию микророзеток *B. riger elatior* изучаемых сортов (2,69 мкМ НУК и 1,14 мкМ ИУК)

Fig. 9 Influence of BAP concentrations on micro-rosettes 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°C, что существенно облегчало процесс клонального микроразмножения (табл. 3).

Таблица 3

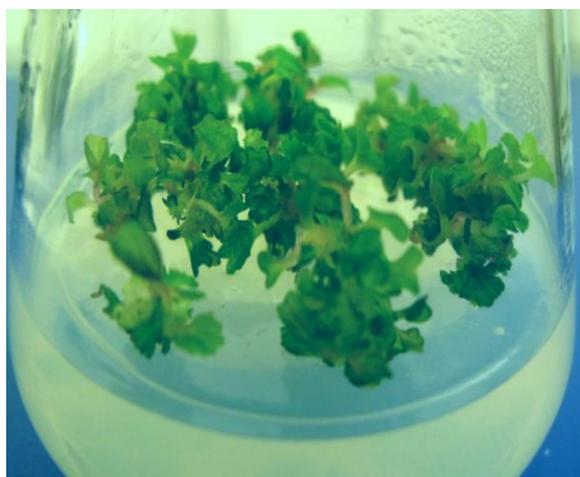
**Влияние температуры культивирования на регенерационную способность *in vitro* высечек листа и сегментов соцветий *B. riger elatior***

Table 3

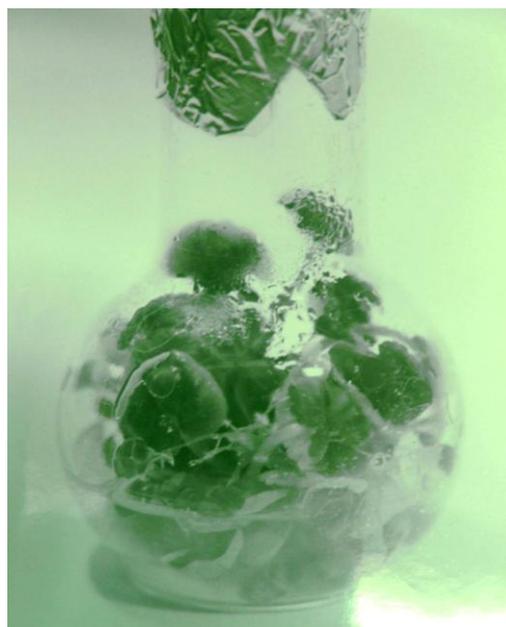
**Influence of temperature during the cultivation on regeneration ability *in vitro* of leaf discs and inflorescence segments in *B. riger elatior***

Температура, °C	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  $30,2 \pm 5,2$  шт. у сорта Krefeld,  $31,3 \pm 1,7$  шт. у сорта Schwabenland,  $27,9 \pm 1,2$  шт. у сорта Nixi red,  $26,6 \pm 1,2$  шт. у сорта Nixi rose и  $21,3 \pm 2,7$  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 hormone-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  $4,15 \pm 1,2$  шт. на побег, а их средняя длина –  $2,51 \pm 1,2$  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

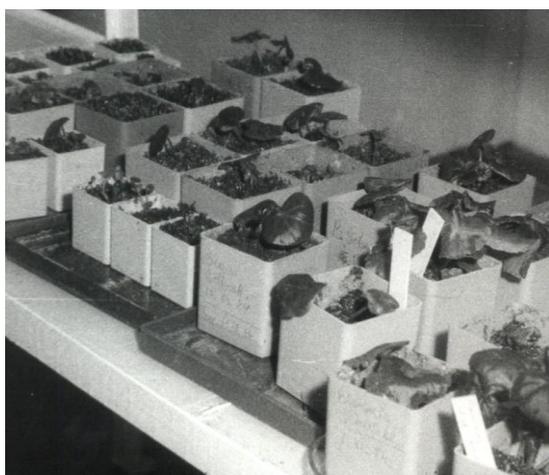


Рис. 12 Адаптированные растения *B. riger elatior*  
Fig. 12 Adapted plants of *B. riger elatior*



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 вычлняют 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 x 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 тиамин-НСI, 2,96 мкМ пиридоксин-НСI, 4,06 мкМ никотиновой кислоты, 3% сахарозы, 0,8% агара, дополненной различными комбинациями и концентрациями цитокининов (1,39-5,93 мкМ кинетин, 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
<b>Макросоли, мг/л:</b>			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	825	825	825
KNO <sub>3</sub>	950	950	950
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	220	220	220
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	185	185	185
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85	85	85
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	13,9	13,9	13,9
Na <sub>2</sub> ЭДТА·2H <sub>2</sub> O	18,65	18,65	18,65
<b>Микросоли, мг/л:</b>			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,1	3,1	3,1
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	11,2	11,2	11,2
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,0125	0,0125	0,0125
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,0125	0,0125	0,0125
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	4,3	4,3	4,3
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,125	0,125	0,125
KI	0,415	0,415	0,415
<b>Витамины, мкМ:</b>			
Глицин	8,61	8,61	8,61
Тиамин-НСI	0,29	0,29	0,29
Пиридоксин-НСI	2,96	2,96	2,96
Никотиновая к-та	4,06	4,06	4,06
Мезоинозит	555,1	555,1	555,1
<b>Регуляторы роста, мкМ:</b>			
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

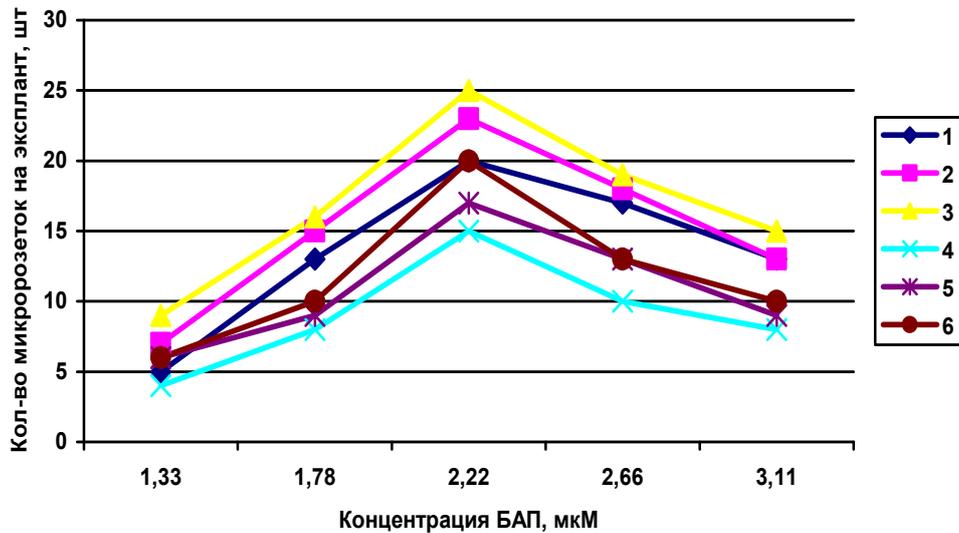


**Рис. 15** Регенерация микророзеток *S. ionantha* на питательной среде S 1, дополненной 2,22 мкМ БАП и 0,27-1,07 мкМ НУК  
**Fig. 15** Microrosettes of *S. ionantha* regeneration on medium S 1 with 2,22 μM BAP and 0,27-1,07 μM NAA

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 зеленолистных 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

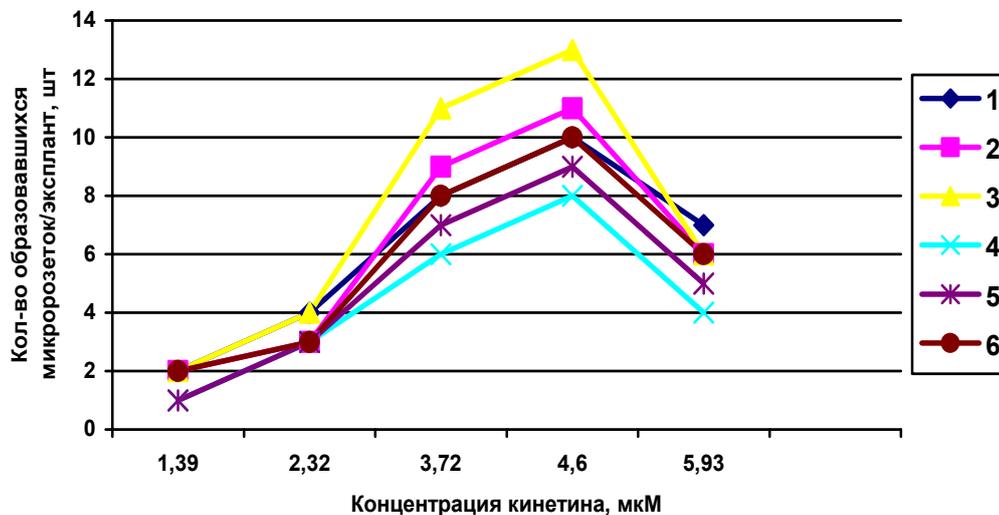
замедляет процесс регенерации микропобегов на листовых эксплантах гибридных *S. ionantha*, при этом образуется меньшее количество микророзеток на эксплант.



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 micro-rosettos 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 micro-rosettos 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 x 0,8 – 1 x 1 см [6]. При использовании нами высечек листа размером 0,4 x 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 x 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 x 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 сортов *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 28°C – до появления адвентивных почек по краям высечки листа, а затем их переносят в культуральное помещение с температурой 23±1°C, 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).

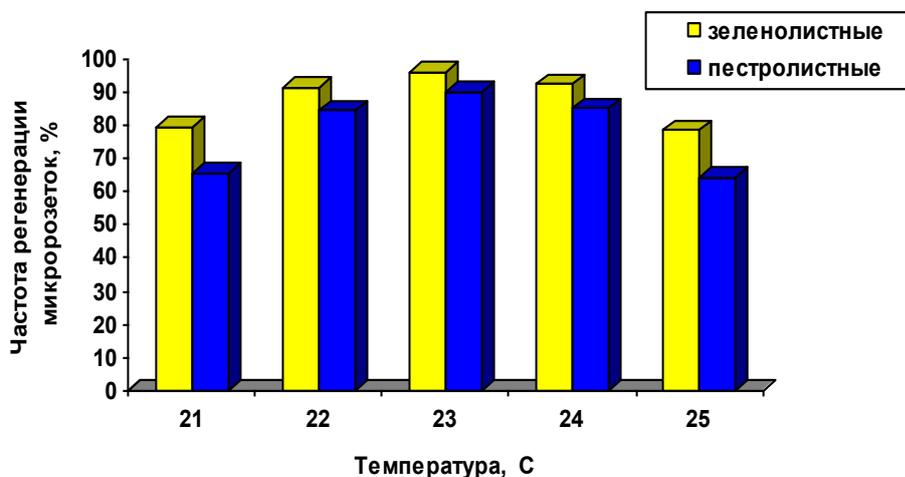


Рис. 18 Зависимость частоты регенерации микророзеток двух форм *S. ionantha* от температуры культивирования

Fig. 18 Dependence of regeneration frequency of microshoots in two forms of *S. ionantha* on temperature during the cultivation

Сформировавшиеся микророзетки быстро разрастались по всей поверхности экспланта. 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 экспланты *S. ionantha* в культуре *in vitro* способны к органогенезу на питательной среде МС в отсутствие 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  $\frac{1}{2}$  нормы солей по МС способствует 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  $4,0 \pm 0,6$  шт. до  $6,1 \pm 0,8$  шт. корней на микророзетку со средней длиной  $1,5 \pm 0,6$  см -  $2,1 \pm 0,7$  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 Mottled 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 x 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 тиамин-НСI, 2,96 мкМ пиридоксин-НСI, 4,06 мкМ никотиновой кислоты, 3% сахарозы, 0,8% агара. Значение рН 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 25°C в отсутствии освещения, а также в культуральной комнате на свету при постоянной температуре 24±1°C, 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 вычлняют 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 (С11 и С12) и подобраны оптимальные концентрации

цитокинина для индукции морфогенетических процессов в тканях листа (табл. 6). Значение рН 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 С1 1	Индукция органогенеза С1 2	Ризогенез С1 3
<b>Макросоли, мг/л:</b>			
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	1650	825
KNO <sub>3</sub>	1900	1900	950
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	440	220
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	370	185
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170	85
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	13,9
Na <sub>2</sub> ЭДТА·2H <sub>2</sub> O	37,3	37,3	18,65
<b>Микросоли, мг/л:</b>			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2	3,1
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22,3	22,3	11,15
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,0125
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,0125
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6	4,3
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,125
KI	0,83	0,83	0,415
<b>Витамины, мкМ:</b>			
Глицин	8,61	8,61	8,61
Тиамин-НСI	0,29	0,29	0,29
Пиридоксин-НСI	2,96	2,96	2,96
Никотиновая к-та	4,06	4,06	4,06
Мезоинозит	555,1	555,1	555,1
<b>Регуляторы роста, мкМ:</b>			
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 меристематидов. 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 Gypsy Rose, 69,9% – сорта Triumphe de Compte, 70,2% – сорта Frieda Nempole 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 эмбриониды, %			
	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 отсутствие 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 эмбрионидов 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 не прямой и прямой соматический эмбриогенез. Эмбриогенные структуры в основном активно формировались в местах соединения листовой пластинки с черешком (рис. 23).

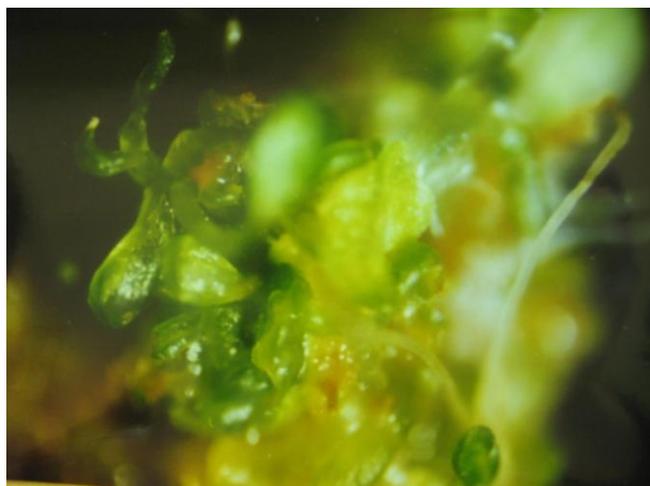


Рис. 23 Формирование эмбриогенных структур на листовых эксплантах *C. hortulanum*  
Fig. 23 Formation of embryogenic structures on leaf explants of *C. hortulanum*

При культивировании эксплантов на питательной среде С1 1, дополненной 2,32-3,25 мкМ кинетина и 5,37 мкМ НУК среднее количество соматических эмбрионидов 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 эмбрионидов у сорта Candidum 11 ± 1,4 шт. отмечали при концентрации кинетина 3,25 мкМ.

Вторичный эмбриогенез индуцируют при пассажах соматических зародышей на питательную среду С11. Образование вторичных эмбриоидов наблюдали на первичных соматических зародышах, прорастающих на поверхности высечки листа. В процессе выполнения эксперимента было установлено, что на питательной среде С11 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.

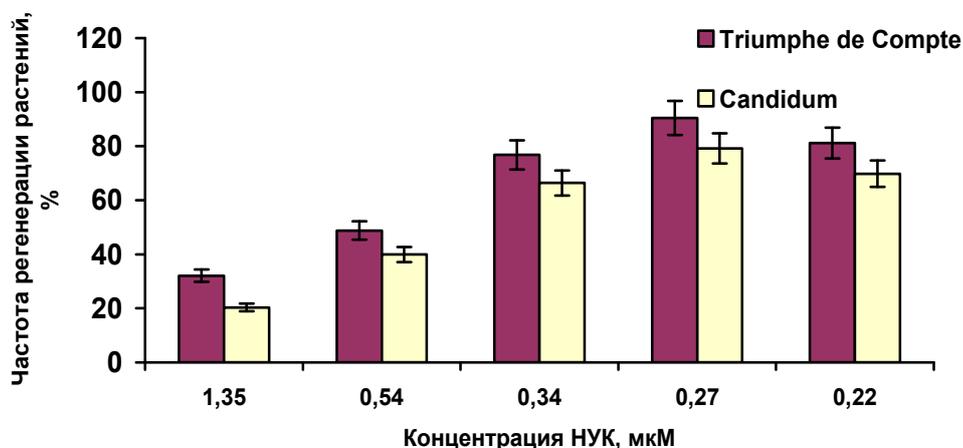


Рис.24 Влияние концентрации НУК на частоту регенерации растений из соматических зародышей двух сортов *C. hortulanum*

Fig. 24 Influence of NAA concentration on frequency 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 С1 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 С12, 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 потенциал 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 С12, 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  $\mu$ M BA and 2,69  $\mu$ M NAA

Растения легко отделяют от 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°C [35]. Установлено, что повышение и понижение температуры культивирования не влияло столь значительно на развитие эмбриоидов. Наилучший результат был получен при температуре 25°C. Количество соматических зародышей достигало в среднем 20,4 $\pm$ 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 $\pm$ 1°C. Полученные микропобеги были нормально сформированы, имеют ярко-зеленую окраску. Понижение температуры (21-22°C) как и ее повышение (26-27°C) 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).

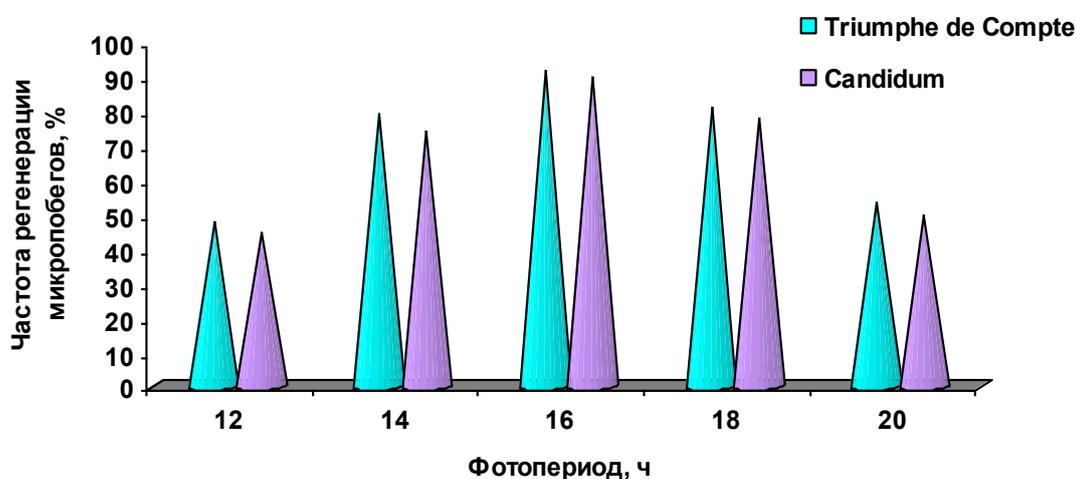


Рис. 27 Влияние длины фотопериода на регенерационную способность листовых эксплантов двух сортов *C. hortulanum* (прямая регенерация)

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 С13 (1/2 нормы солей по МС) НУК, ИМК, ИУК в различных концентрациях и сочетаниях для индукции ризогенеза показало, что спустя 14 суток на питательной среде С13, 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 – perlite; 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 <i>in vitro</i>			
	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 экспланта, шт.	Продолжительность размножения, мес	Период доращивания до товарного вида, мес
<i>B. riger elatior</i>	укоренение черенков	2-8	9-12	высечка листа 1x1 см	45-50	3-4	3-3,5
<i>C. hortulanum</i>	деление клубня	2-3	4-6	высечка листа 1x1 см	18	3-3,5	3
<i>S. ionantha</i>	укоренение черенков	5-20	8-12	высечка листа 1x1 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 экспланта 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

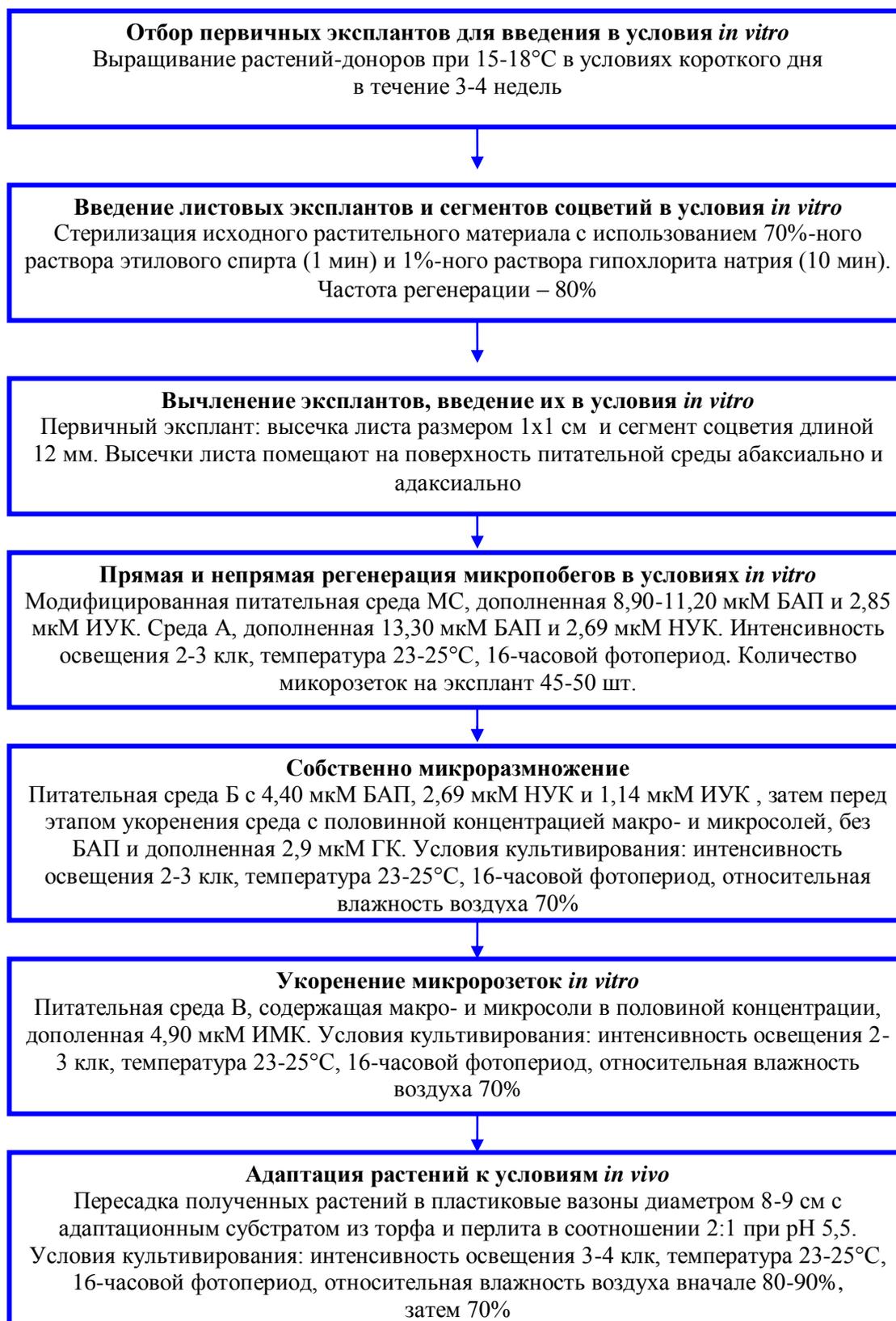


Рис. 30 Биотехнологическая схема клонального микроразмножения *B. riger elatior*  
Fig. 30 Biotechnological scheme of clonal micropropagation *B. riger elatior*

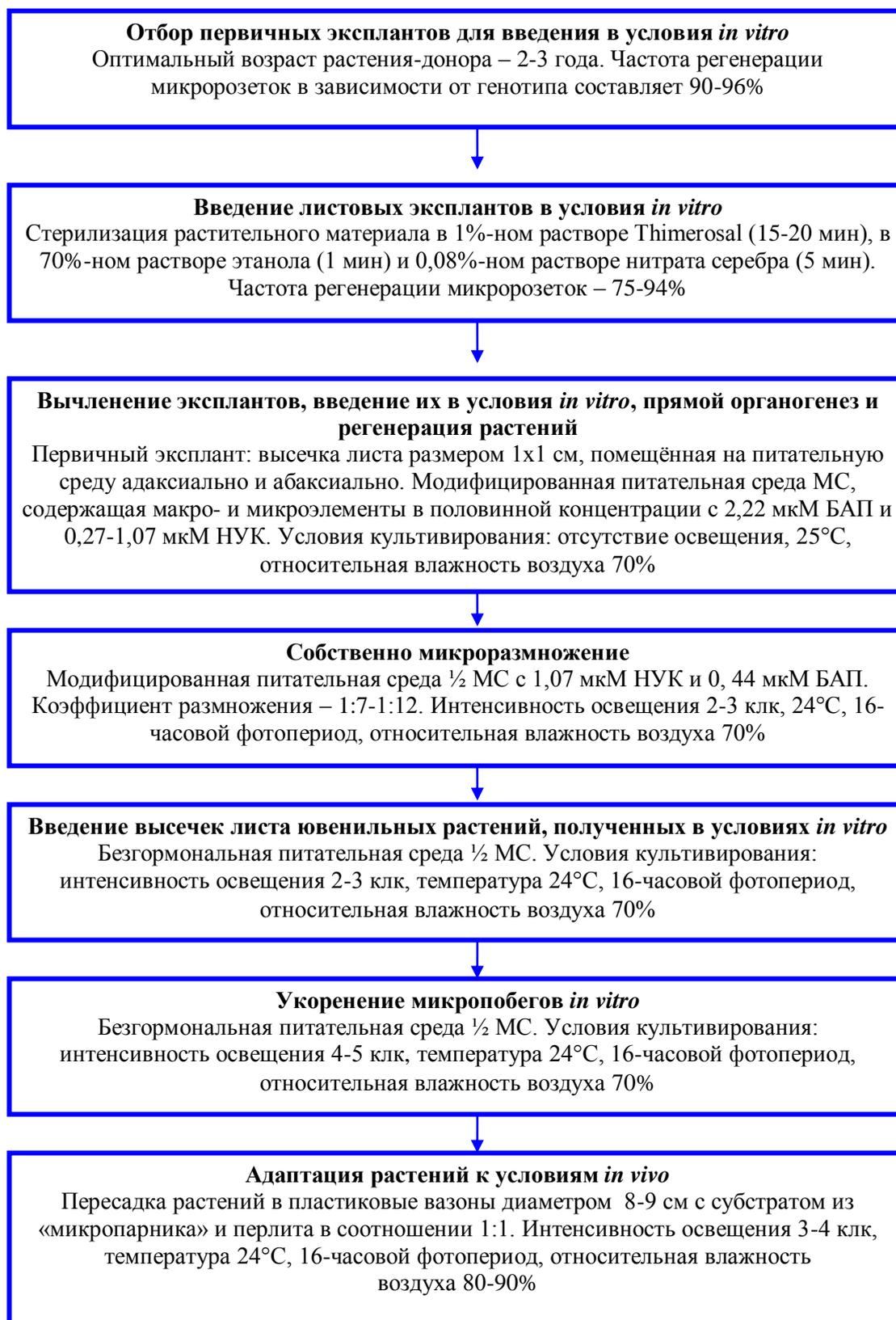


Рис. 31 Биотехнологическая схема клонального микроразмножения *S. ionantha*  
Fig. 31 Biotechnological scheme of clonal micropropagation *S. ionantha*

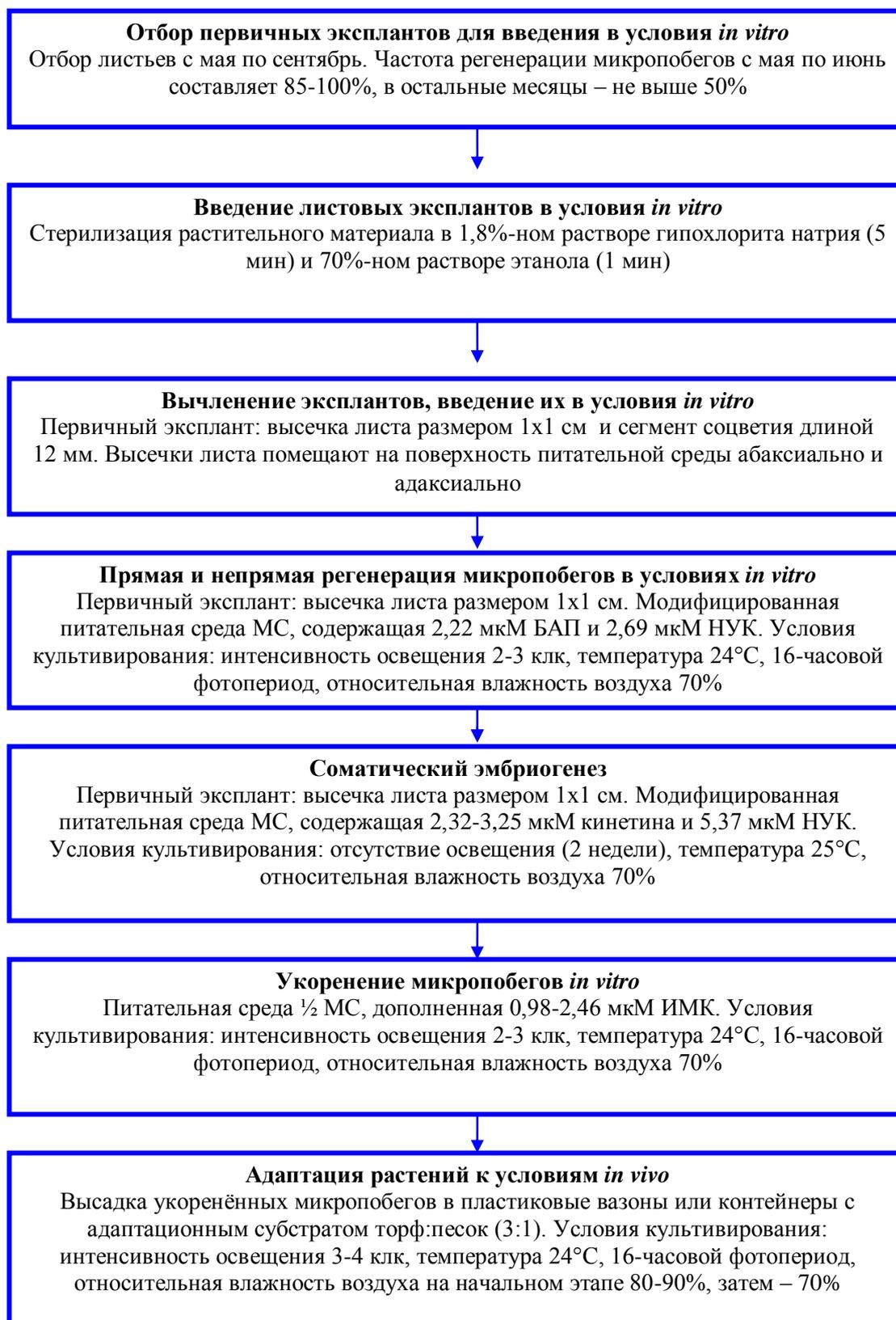


Рис. 32 Биотехнологическая схема клонального микроразмножения *C. hortulanum*  
Fig. 32 Biotechnological scheme of clonal micropropagation *C. hortulanum*

соцветий *B. riger elatior* осуществляется при температуре 23-25°C, 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 регенерируют 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°C, 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 Кнопю, 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 С1 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 составляет 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 // Ягодководство 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., Кушинир Г.П., Сарнацкая В.В.* Технология микрклонального размножения растений. – К.: Наукова думка, 1992. – 232 с.
7. *Катаева Н.В., Бутенко Р.Г.* Клональное микроразмножение растений. – М.: Наука, 1983. – 96 с.
8. *Котовицкова 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., Смержевская 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. – Jaipur: 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 double petunia // Hort. Science. – 1976. – Vol. 11. – P. 35.
24. Dittmer C., Oertel C. Der Aufbau virusfreier Pelargonien durch Meristemkultur, Wärmebehandlung und Virusverlust // Tag.-Ber. Akad. Landwirtsch. – Berlin: Wiss. DDR. – 1980. – N 184. – S. 425–430.
25. Duan J.X., Yasawa S. 6-Benzyladenine and low night temperature treatments induce early flowering in young *Phalaenopsis* seedlings // Jap. J. Trop. Agric. – 1994. – Vol. 38. – P. 60–76.
26. Fonnesebech A., Fonnesebech 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 *Lykoria 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* spp) // Plant Cell Rep. – 1999. – Vol. 18, N 6. – P. 467–472.
37. Knop W. Quantitative Untersuchungen über den Ernährungsprozess 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 Hort. 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 1<sup>st</sup> 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 growth regulators for stages of induction of explant development, microshoots regeneration and their rooting have been chosen.

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

УДК 504.73:57.085.2

## МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ В ИССЛЕДОВАНИИ ОРГАНОГЕНЕЗА И СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА *IN VITRO* ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВ RANUNCULACEAE, CANNACEAE, MORACEAE, ROSACEAE, MYRTACEAE, OLEACEAE, ACTINIDIACEAE

И.В. МИТРОФАНОВА, О.В. МИТРОФАНОВА, Н.В. КОРЗИНА,  
Н.П. ЛЕСНИКОВА-СЕДОШЕНКО, Н.Н. ИВАНОВА, А.Ш. ТЕВФИК,  
Т.И. ПИЛИПЧУК, А.Ю. ЗАЯЦ, С.В. ЧЕЛОМБИТ, Г.И. МЕЛИХОВА

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр, г. Ялта

В работе отображены методические подходы в организации лабораторных исследований морфогенеза *in vitro* у высших растений: подбор информации о растительных объектах, особенности оснащения лаборатории (оборудование и материалы), требования к приготовлению стерильной посуды, инструментов и дистиллированной воды для асептических работ. На основе полученных результатов выделены основные этапы регенерации растений, представителей семейств Ranunculaceae, Cannaceae, Moraceae, Rosaceae, Myrtaceae, Oleaceae, Actinidiaceae через органогенез и соматический эмбриогенез в условиях *in vitro*.

**Ключевые слова:** методические подходы, органогенез, соматический эмбриогенез, *in vitro*.

### Введение

Биотехнологические подходы, основанные на культивировании органов, тканей и клеток многолетних садовых растений вне организма, на искусственных питательных средах, в регулируемых асептических условиях открывают принципиально новые возможности для фундаментальных и прикладных исследований. Растительные системы *in vitro* являются удобными моделями для исследования сложных механизмов, лежащих в основе пролиферации, клеточной дифференцировки, гистогенеза, органогенеза, соматического эмбриогенеза и регенерации целого организма из культивируемых клеток, обладающих тотипотентностью [1, 2, 4, 6, 10, 12, 13, 24, 27].

Теоретическую основу абсолютно всей методологии культуры клеток, органов и тканей, в том числе и клонального микроразмножения, составляет морфогенез *in vitro*.

Соматический эмбриогенез представляет собой процесс асексуального развития зародышеподобных структур, как из репродуктивных, так и из соматических тканей путем, напоминающим зиготический эмбриогенез. Первые результаты по индукции соматического эмбриогенеза были получены в суспензионной культуре моркови [30, 32]. В своей работе F. Steward с соавторами [33] упоминал о том, что лишь при соблюдении двух основных условий соматическая клетка начинает вести себя подобно зиготе: 1) клетка должна быть отделена от сдерживающего ее рост влияния соседних клеток и тканей; 2) необходимым является присутствие кокосового молока в питательной среде для культивирования. Однако его концепция в настоящее время опровергнута. Так, известно, что началу эмбриогенеза предшествует образование многоклеточных агрегатов. Подтверждением этого процесса являются данные электронно-микроскопического изучения каллуса *Ranunculus sceleratus* L. [35].

Органогенез представляет собой процесс образования *de novo* адвентивных побегов и корней в неорганизованно растущей массе каллуса (непрямая регенерация) и непосредственно из клеток листа, стебля или цветка (прямая регенерация) [3, 4, 11, 13, 19, 20, 34].

В исследованиях, проведенных нами ранее, была показана возможность получения и массового размножения целого ряда сортов и форм растений через

соматический эмбриогенез или органогенез у таких культур как зизифус, хурма, актинидия, фейхоа, персик, абрикос, алыча, вишня, слива, черешня, хризантема, гвоздика, роза, фрезия, гладиолус, тюльпан, каладиум, антуриум, лилия, гиацинт, гиппеаструм, гербера, фиалка, орхидеи, юкка, клематис, фикус, полынь лимонная и метельчатая, котовник, иссоп и др. [5, 7-9, 13-18].

Исследования, направленные на глубокое изучение процессов соматического эмбриогенеза и органогенеза в условиях *in vitro*, весьма актуальны, так как не только позволяют пополнить знания о морфогенезе растений в целом, но и найти практическое применение полученным результатам. Конечной целью изучения является разработка и представление основных методических подходов, касающихся организации и проведения биотехнологических исследований для дальнейшего получения и сохранения ценных видов и сортов декоративных, плодовых и лекарственных растений.

### Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования были использованы виды и сорта, отобранные нами в коллекционных насаждениях Никитского ботанического сада – Национального научного центра: актинидия превосходная (*Actinidia deliciosa* (Chev.) Liang, Ferguson), инжир (*Ficus carica* L.), канна садовая (*Canna × hybrida hort.*), клематис (*Clematis* L.), роза миниатюрная (*Rosa chinensis* var “*minima*” L.), маслина европейская (*Olea europaea* L.), фейхоа (*Feijoa sellowiana* Berg.). Вместе с тем часть растительных объектов были собраны в горах Крыма: лапчатка седоватая (*Potentilla canescens* Bess.), лапчатка прижатая (*P. depressa* Willd.), лапчатка прямая (*P. recta* subsp. *laciniosa* (Waldst. Et Kit. Ex Nestler) Nyman).

В экспериментальной работе использованы как общепринятые биотехнологические методы, так и разработанные нами, либо модифицированные применительно к конкретным требованиям и целям опытов [2, 6, 13, 14, 18, 22, 27].

### Результаты и обсуждения

Наряду с правильно поставленной целью выбор объекта исследования определяет направленность разрабатываемой методологии. Необходимым является наличие информации об изучаемом растительном объекте: вид или сорт и их принадлежность, знания о биологии развития дает возможность раскрыть потенциал растения в созданных искусственных условиях. Определяющими факторами являются особенности оснащения лаборатории (оборудование и материалы) и основные принципы приготовления стерильной посуды, инструментов и дистиллированной воды для проведения асептических работ. Разработанные основные протоколы регенерации растений через органогенез и соматический эмбриогенез *in vitro* служат неотъемлемой частью методологии биотехнологических исследований.

#### Информация о растительных объектах

**Актинидия превосходная**, или **киви** (*Actinidia deliciosa* (Chev.) Liang, Ferguson), относится к роду *Actinidia* Lindl. и семейству Actinidiaceae. Это листопадный лианоподобный куст с листьями, очередными без прилистников. Почки очень мелкие, размещены в выпуклом основании листа. Цветки в большей степени двудомные. Плод – ягода с огромным количеством мелких семян, богат на биологически активные вещества, микроэлементы и обладает прекрасными вкусовыми качествами (рис. 1 а). По содержанию витамина С превышает плоды лимона. Исследования проводили на 2 гибридах (Аббот х Томури, Аббот х (Бруно х Томури) и 4 сортах (Бруно, Монти, Аббот и Сааништон).

**Инжир** (*Ficus carica* L., семейство Moraceae) – одно из самых древних культурных растений, родом из юго-западной части Малой Азии (Карии), широко

распространен и выращивается в странах Средиземноморья, Ближнего Востока, Египте, США, Китае, Индии, на Кавказе и в Средней Азии. В бывшем СССР инжир произрастает и возделывается на южном берегу Крыма. Среди субтропических плодовых культур популярность инжира и перспективность его выращивания обусловлены продуктивностью деревьев, высокими вкусовыми, питательными и лечебными свойствами плодов (рис. 1 б). В качестве лекарственного сырья используют не только плоды, но и листья инжира. Свежие плоды инжира содержат до 23% сахаров (глюкоза, фруктоза), сушеные – до 75%. В плодах содержатся органические кислоты, витамины, пектиновые и минеральные вещества, в листьях – кумарины. Плоды инжира употребляют в свежем, сушеном и консервированном виде (компоты, варенье, джем, цукаты). Исследования проведены на 14 сортах: Янтарный, Сабруция Розовая, Смена, Финиковый, Фиолетовый, Белый ранний, Кадота Золотистая, Лимонно-Желтый, Violeta, Крымский 37, Крымский Черный, Приятный, Черный Сан Педро, Брунвик.

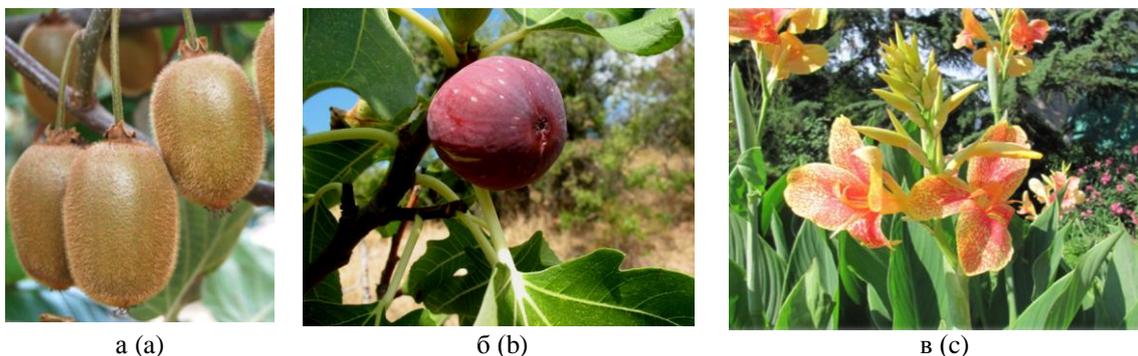


Рис. 1 Исходные растения киви (а), инжира (б) и канны садовой (в) для введения в условия *in vitro*  
 Fig. 1 Donor plants of *Actinidia deliciosa* (а), *Ficus carica* (б) and *Canna × hybrida hort.* (с) for *in vitro* introduction

**Канна садовая** (*Canna × hybrida hort.*) относится к роду *Canna* L., семейству Cannaceae Juss., порядка Zingiberales. Эта цветочная культура широко используется в декоративном садоводстве и представляет интерес благодаря крупным малиновым, красным, оранжевым, лососевым, желтым цветкам, собранным в соцветия, и листьям от сизо-зеленой до фиолетово-красной окраски (рис. 1 в). Вегетативное размножение проводят делением корневищ в весенний период перед высадкой. Семена *C. hybrida* прорастают трудно, через несколько месяцев, а иногда в течение всего года, в зависимости от условий их проращивания. Исследования проводили на 4 сортах канны садовой из коллекционных насаждений НБС – ННЦ: 2 сорта селекции НБС (Дар Востока, Ливадия) и 2 сорта зарубежной селекции (Президент, Суевия).

**Клематис** или ломонос относится к роду ломонос (*Clematis* L.) и семейству Ranunculaceae Juss. Это кустарник или травянистый многолетник, большинство которых относится к группе лиан. Цветки собраны в соцветия или одиночные, и не имеют лепестков. Сорта значительно отличаются друг от друга сроками цветения, формой, окраской, махровостью и размером цветков (рис. 2 а). Растения клематиса высок декоративны, применяются для озеленения, содержат дубильные вещества, эфирные масла и фитонциды. Исследования выполняли на 13 сортах (Ville de Lyon, Madam le Coultre, Юность, Алёша, Mrs Cholmondeley, Dr. Ruppel, Nelly Moser, Multi Blue, Лютер Бербанк, Юбилейный-70, Алёнушка, Kakio, Sunset).

**Роза миниатюрная** (*Rosa chinensis* var “*minima*” L.). Род *Rosa* L., семейство Rosaceae. Растения напоминают крошечные копии чайно-гибридных роз, от 1.5 до 4 см в диаметре, с богатым диапазоном цветовой гаммы: красной, оранжевой, желтой, розовой, белой, двухцветной, редкой зеленой и лиловой с голубоватым оттенком

окраски, а также, меняющейся по мере старения цветка от лимонно-желтой до вишнево-красной (рис. 2 б). Важной биологической особенностью миниатюрных роз является раннее сильное и длительное, многократно повторяющееся цветение, длящееся в условиях ЮБК до 200 дней (с середины апреля до декабря-января), что делает их незаменимыми в озеленении садов и парков, где они могут быть использованы для создания низких бордюров и рабаток, а также карликовых штамбов. Миниатюрные розы хороши также в горшечной культуре. Объектами настоящего исследования служили перспективные сорта садовой группы миниатюрных роз из коллекции НБС–ННЦ. Сорта селекции НБС–ННЦ: Мальчик-с-Пальчик. Мин. (создан К. Зыковым, З. Клименко в 1979 г.), Гранатовый Браслет. Мин. (создан З. Клименко в 2002 г.). Сорта иностранной селекции: Бэби Бантинг. Мин. *Baby Banting*. Мин. (de Vink, 1953). *Ellen* x *Peon.*, Цвѣргкѳниг. Мин. *Zwergkѳnig (Dwarfking)*. Мин. (Kordes, 1957). *World`s Fair* x *Peon.*; Mr. Bluebird – Мистер Блюбѳрд. Мин. (R.S. Moore, 1960) Old Blush X Old Blush; Sunmaid – Санмейд. Мин. (J. Spek, 1972); Rouletii – Рулети. Мин. (Roulet, 1920); Cinderella – Синделелла. Мин. (de Vink, 1953). Cecile Brunner x Tom Thumb; Popcorn – Попкорн. Мин. (Morey, 1973). Katharina Zeimet x Diamond Jewel; Мандарин; Бигуди.



Рис. 2 Исходные растения клематиса (а), розы миниатюрной (б) и лапчатки (в) для введения в условия *in vitro*

Fig. 2 Donor plants of *Clematis* sp. (a), *Rosa chinensis* var "minima" (b) and *Potentilla* sp. (c) for *in vitro* introduction

**Лапчатка седоватая** (*Potentilla canescens* Bess.). Род Лапчатка (*Potentilla*), семейство Rosaceae. Представляет собой многолетнее травянистое растение 10-65 см высотой с мощным корневищем. Стебли прямые, одеты длинными волосками. Корневые и нижние стеблевые листья пальчатораздельные, верхние стеблевые 3-5-раздельные, короткочерешчатые. Листочки зеленые, сверху негустоприжатоволосистые, снизу тонкоседовойлочные. Чашелистики острые, лепестки немного длиннее чашелистиков, желтые. Цветет в июле-августе. В корневищах и цветках обнаружены следы алкалоидов, в листьях и цветках - витамин С. С лечебной целью используются корневища, стебли, листья, цветки. Отвар корневищ применяется при меноррагии, поносе, гематурии. Трава употребляется местно при ларингите. Декоративное, лекарственное, редкое или охраняемое

**Лапчатка прижатая** (*P. depressa* Willd.). Род *Potentilla*, семейство Rosaceae (рис. 2 в). Многолетняя трава высотой 3-15 см. Всё растение, как правило, очень густо железистое, в живом состоянии на ощупь клейкое. Прикорневые листья на сравнительно коротких и коротко-волосистых черешках; стебли часто заметно длиннее их. Листочки широкие и короткие, приблизительно вдвое длиннее своей ширины, обратно-яйцевидные или широко-обратно-яйцевидные с клиновидным цельнокрайним

основанием, в верхней части со сравнительно немногочисленными, в числе (2)3-6(7) с каждой стороны, тупыми или даже закруглёнными зубцами; мохнатые от густых длинных волосков. Соцветие чаще весьма многоцветковое. Чашелистики более широкие и тупые, чем у *P. humifusa*, с которой в остальном растение сходно. Цветёт в мае - июне. Эндемик Крыма (яйлы). Декоративное. Химический состав и полезные свойства не изучены.

**Лапчатка прямая** (*P. recta* subsp. *laciniosa* (Waldst. Et Kit. Ex Nestler) Nyman). Род *Potentilla*, семейство Rosaceae (рис. 2 в). Многолетнее растение, стебли 30-60 см высотой, прямые, как и черешки листьев, густо покрыты очень короткими и более редкими длинными волосками. Прикорневые и нижние стеблевые листья пальчатые, с 5-7 листочками, с обеих сторон зеленые, жестковолосистые, листочки 2-6 см длиной, 1-1.5 см шириной, продолговатые, крупнозубчатые. Цветки (15)20-25 мм диаметром, обычно в многоцветковом щитковидном соцветии. Чашечка густоволосистая, короче венчика. Наружные линейные чашелистики почти равны широколанцетным внутренним. Орешки морщинистые. Надземная часть содержит дубильные вещества, витамин С, урсоловую кислоту, фенолкарбоновые кислоты и их производные: кофейную, п-кумаровую, феруловую, эллаговую; флавоноиды в гидролизате: кверцетин, кемферол, цианидин. Применяется в гомеопатии. Корневища. Вяжущее, закрепляющее и гемостатическое. Спиртовой и водный настои, мазь, порошок – для лечения ран, панарициев. Экстракты пригодны для дубления кож. Окрашивает ткани в черный цвет. Декоративное, редкое или охраняемое.

**Маслина европейская** или **олива** (*Olea europaea* L.) – одно из древнейших культурных растений, относящихся к семейству Oleaceae (рис. 3 а). Плоды маслины и получаемое из них оливковое масло – ценные легкоусвояемые диетические продукты питания, обладающие терапевтическим действием. Оливковое масло применяют не только в пищевой промышленности, но и в мыловарении, а древесину – в столярном деле. Вечнозелёное оливковое дерево декоративно, неприхотливо, хорошо переносит обрезку и способно расти на каменистых почвах, благодаря чему широко используется в озеленении городов ЮБК. В Никитском ботаническом саду собрана единственная в Украине и одна из крупнейших в СНГ коллекция, насчитывающая 228 сортов и гибридов маслины. Объектами исследования служили 6 перспективные сорта и 1000-летнее дерево маслины: 4 сорта селекции НБС (Никитская, Никитская Крупноплодная, Обильная, Крымская Превосходная) и 2 кавказских сорта (Толгомская и Ломашенская).



а (a)



б (b)

Рис. 3 Исходные растения маслины европейской (а) и фейхоа (б) для введения в условия *in vitro*  
Fig. 3 Donor plants of *Olea europaea* (a) and *Feijoa sellowiana* (b) for *in vitro* introduction

**Фейхоа** (*Feijoa sellowiana* Berg.) относится к семейству миртовых (Myrtaceae) (рис. 3 б). Это вечнозеленый куст (дерево) высотой до 2,5-3 м с диаметром кроны 3 м и больше. Листья сплошные и эллипсовидные по форме, плотные, кожистые, зеленые,

блестящие с верхней стороны и серебристо-серые, опушенные с низу. Цветки обоеполые, крупные ( $\varnothing$  3-4 см). Плод фейхоа – ненастоящая ягода с четырьмя многосторонними гнездами. Фейхоа – скороспелая субтропическая культура; плоды богаты на пектины, углеводы, витамин С, Р-активные вещества, полифенольные вещества с преобладанием катехинов. В них содержится большое количество йода. Это морозостойкое растение, которое выдерживает понижение температуры до  $-10-12^{\circ}\text{C}$ . Исследование проводили на сорте Никитская Ароматная и 2 селекционных формах ( $\Phi_1$  и  $\Phi_2$ ).

#### **Особенности оснащения лаборатории (оборудование и материалы)**

Лаборатория должна быть укомплектована необходимыми приборами, оборудованием, инструментами, химической посудой, реактивами и иметь следующие помещения: а) *моечная комната* должна иметь горячую и холодную воду, мойки с кислотоустойчивого материала или специальный резервуар для обработки посуды кислотой, щелочами или другими моющими средствами, оборудована дистиллятором или ионообменником и бидистиллятором, сушилкой, сушильным шкафом, а также рабочими столами; б) *комната для стерилизации* инструментов, посуды, питательных сред, дистиллированной воды и т.д. должна быть оборудована горизонтальным или вертикальным автоклавом, банями, дистиллятором, бидистиллятором, сушильными шкафами для стерилизации горячим воздухом, а также столами та полками для размещения на них стерильных предметов и те, что стерилизуются. По необходимости моечную комнату и комнату для стерилизации можно объединить (рис. 4 а); в) *комната для приготовления, сохранения и разлива питательных сред* должна быть оборудована несколькими типами весов (в т.ч. аналитическими), холодильниками, колбагревателем, магнитными мешалками, лабораторными электроплитами, рН-метром (рис. 4 б), водяной баней с шейкером, вортексом, центрифугою, термошкафом, лабораторными столами, шкафами и полками для сохранения чистой лабораторной посуды, реактивов и других материалов. В этой комнате должны быть обязательно вытяжной шкаф для работы с ядовитыми веществами, кислотами и щелочами; г) *операционная комната*, в которой проводят изоляцию меристем, вегетативных почек, листьев, микропобегов, зародышей и их дальнейшее субкультивирование, должна быть обеспечена максимальной стерильностью. Стены, пол и потолок комнаты должны быть без щелей, гладкие и легко мыться различными дезинфицирующими растворами промышленного производства (хлорамин и др.). Желательно, чтобы комната не имела окон или они были полностью герметичными. Комната должна быть оборудована бактерицидными лампами. Для работы по выделению эксплантов в асептических условиях необходимо использовать ламинарные боксы разных типов и классов чистоты с бактерицидными фильтрами, например *Fatran Lf* (Чехия) та *БП-4-004* (Украина) (рис. 4 в). В операционной комнате должны быть столы и полки для размещения стерильных питательных сред и подсобных материалов. Для работы в ней необходима специальная стерильная одежда: халаты, повязки из марли или другого специального материала, специальная обувь и головной убор. В операционной по изолированию меристем должен быть использован бинокулярный микроскоп МБС-10 или соответствующей марки зарубежный аналог с увеличением в 30-40 раз; д) *культуральная комната* (культуральная или ростовая камера) для культивирования вегетативных почек, листовых дисков, микропобегов, каллуса, соматических и зиготических зародышей, а также выращивания полученных регенерантов, в которой с большой точностью поддерживаются заданные температура, влажность воздуха, освещение и регулируется фотопериод (соотношение день/ночь: 14/10 – 16/8), оборудованная кондиционером (климатконтролем), бактерицидной лампой или стерилизатором воздуха, полочками или металлическими стеллажами, покрытыми прозрачным материалом (стеклом, термостойким и светоустойчивым прозрачным пластиком) для размещения штативов с

пробирками и другой культуральной посуды так, чтобы они не притеняли друг друга. Освещение может быть боковым или верхним. К штативам с пробирками, колбам, банкам должен быть обеспечен свободный доступ для наблюдения за состоянием почек, листовых дисков, развитием зародышей, эмбриоидов и микропобегов, а также ростом регенерантов. Желательно при входе в лабораторное помещение иметь тамбур для переодевания в стерильную одежду и обувь; е) *комната для гистологических и цитологических исследований* должна быть оснащена стереоскопическими бинокулярными, конфокальным, сканирующим и световым микроскопами, предметными и покровными стеклами, микротомом, весами, вытяжным шкафом, водяной баней, лабораторной посудой и реактивами.



а (a)



б (b)



в (c)

**Рис. 4 Организация биотехнологической лаборатории: а) объединенные комнаты моечной и стерилизационной; б) комната для приготовления, сохранения и разлива питательных сред; в) операционная комната**

**Fig. 4 Organization of the biotechnology laboratory: a) the combined washing and sterilization room; b) a room for cooking, preserving and dispensing of culture media; c) the operating room**

**Посуда и инструменты.** Для приготовления питательных сред и культивирования изолированных эксплантов исследуемых растений с целью получения растений через органогенез и соматический эмбриогенез должна быть использована следующая лабораторная посуда: чашки Петри, колбы (150-250 мл), банки (200 мл), пробирки, химические стаканы, пипетки, пипетманы или дозаторы (50-200 мкл, 200-1000 мкл), предметные или покровные стекла, спиртовки. Следует использовать посуду из термостойкого стекла или других термостойких материалов, особенно при приготовлении питательных сред или автоклавировании. Для отделения эксплантов и пересаживания растительного материала применяются стерильные шпатели, пинцеты, пики, медицинские, брюшные и глазные скальпели. Стерильная фольга должна быть использована для закрывания колб, банок и пробирок. При длительном субкультивировании, кроме фольги, применяют парафиновую пленку *Parafilm* (производства «Sigma», США) или стерильную пленку для пищевых продуктов. Вся лабораторная посуда должна быть маркирована.

***Приготовление стерильной посуды, инструментов и дистиллированной воды для проведения асептических работ***

Посуду из стекла тщательно моют моющими средствами в горячей воде, потом промывают проточной водой до полного исчезновения мыльного раствора, споласкивают дистиллированной водой, дают стечь и сушат в сушильном шкафу 1,5-2 часа при температуре 180°C. Чашки Петри та стаканы заворачивают в плотную бумагу (крафт или калька), инструменты моют, вытирают насухо (можно протереть спиртом), заворачивают в фольгу и стерилизуют в сушильном шкафу. Фольгу и фильтровальную бумагу, завернутую в плотную бумагу, стерилизуют сухим горячим воздухом. Колбы (250-300 мл) заливают

дистиллированной водой (150-200 мл), закрывают сначала фольгой, затем плотной бумагой и завязывают шпагатом. Стерилизуют дистиллированную воду 30-40 минут в автоклаве при температуре 120-130°C, давлении 1,5-2,0 атм.

**Основные этапы регенерации растений через органогенез и соматический эмбриогенез в условиях *in vitro***

**Отбор исходного растительного материала для введения в условия *in vitro*.** В качестве первичных эксплантов можно использовать незрелые зародыши, семена, вегетативные почки *in situ*, микропобеги, листовые диски и соматические зародыши *in vitro*. Лучшие сроки отбора для вегетативных почек киви (*A. deliciosa*) – конец февраля - март, фейхоа (*F. sellowiana*) – март - май. Зародыши и семена киви, фейхоа отбирают в период начала созревания плодов (сентябрь - ноябрь).

У инжира в качестве первичных эксплантов используют вегетативные почки, меристематические ткани и верхушки активно растущих побегов. Лучшие сроки отбора вегетативных почек инжира – март - апрель, верхушек активно растущих побегов – июнь - июль.

У маслины в качестве первичных эксплантов используют зародыши, полученные в результате свободного опыления, а также сегменты однолетних побегов с 1-3 междоузлиями взрослых растений. Отбор зрелых плодов для последующего изолирования зародыша необходимо проводить в октябре - ноябре, а сегментов вегетативных побегов – июле, сентябре и декабре.

Для введения в культуру *in vitro* у канны садовой используют вегетативные почки, отделенные от корневища маточных растений и изолированные зародыши, семена, выделенные из коробочки. Лучшими сроками отбора для вегетативных почек канны садовой – ноябрь, для изолированных зародышей и семян – сентябрь - ноябрь.

В качестве первичных эксплантов клематиса используют сегменты побегов с вегетативными почками. Лучше развиваются экспланты клематиса, введенные в условия *in vitro* в фазу активной вегетации растений (март - апрель). Вегетативные почки, введенные в феврале, также показывают высокий морфогенетический потенциал.

У розы миниатюрной в качестве исходных эксплантов используют сегмент побега с пазушной почкой из средней части побега интактного растения. Отбор можно производить на протяжении всего года. Оптимальные сроки – июль - август, ноябрь.

В качестве первичных эксплантов можно использовать семена, междоузлия, высечки листьев, фрагменты черешков, корней, вегетативные почки интактных растений *P. depressa*, *P. recta* subsp. *laciniosa*, *P. canescens*, произрастающих в условиях *in situ*. Отбор растительного материала производится с апреля по ноябрь. Оптимальные сроки для отбора вегетативных почек *P. depressa* – сентябрь - октябрь, *P. canescens* – сентябрь - ноябрь, *P. recta* – август - сентябрь. Семена *P. recta*, *P. canescens* отбирают в июле – начало августа, семена *P. depressa* – в мае - июне.

**Стерилизация растительного материала.** Для поверхностной стерилизации эксплантов в качестве стерилизующих агентов используют 70-90%-ный  $C_2H_5OH$ , 0,08%-ный раствор  $AgNO_3$  («Sigma», США), 1%-ный раствор Thimerosal («Merk», Германия), сулему («Sigma», США), (0,6-4%-ный раствор гипохлорита Ca («Sigma», США) и гипохлорита Na («Дез ТАБ», Медпромвест, Украина). Экспозиция обработки зависит от генотипа, происхождения, типа и размера экспланта. Семена, листья, вегетативные почки и сегменты побегов обычно стерилизуют последовательно в 70%-ном  $C_2H_5OH$  (30 сек – 1 мин), 1%-ном растворе Thimerosal (10-20 мин), 0,08%-ном растворе  $AgNO_3$  (2-5 мин) с добавлением в стерилизующие растворы 2-3-х капель детергента Tween-80 («Sigma», США) или в 1,5%-ном растворе гипохлорита натрия (5-20 мин) и 3-5-разовой промывкой в стерильной дистиллированной воде. Вышеизложенные режимы стерилизации подходят для получения асептической

культуры фейхоа и киви, процент стерильных эксплантов может достичь показателя 80-90. Плоды фейхоа стерилизуют, погружая их в 90-95%-ный  $C_2H_5OH$  на 1-2 секунды с дальнейшим обжиганием в пламени спиртовки, а далее аккуратно, чтобы не повредить, извлекают них зародыши.

В целом, режим стерилизации подбирается под каждый объект конкретно для получения высокого процента эксплантов, свободных от контаминации (засорение спорами грибов и бактериями).

Поверхностную стерилизацию эксплантов инжира проводят, используя 70-90% этанол, 1% раствор Thimerosal и «Дез Таб». Первичные экспланты инжира стерилизуют последовательно в 70% растворе этанола (1 мин), 1% растворе Thimerosal (7 мин) и 0,3% растворе  $NaClO$  (15-17 мин), с последующей 3-4-кратной промывкой в стерильной дистиллированной воде. При выборе такого режима стерилизации количество эксплантов инжира, свободных от грибной и бактериальной инфекций, составляет 80-85% в зависимости от генотипа, происхождения, типа и размера экспланта.

Стерилизацию сегментов побега маслины проводят в несколько этапов. Растительный материал промывают в проточной водопроводной воде с мыльным раствором, затем ополаскивают водопроводной водой, дистиллированной водой и протирают марлевой салфеткой, смоченной в 70% этаноле. Срезав листья, черенки помещают в стерильные стаканы и последовательно обрабатывают растворами стерилизующих агентов. Среди испытанных антисептиков препарат «ДезТаб», оказывал более щадящее действие на сегменты побега исследуемых сортов маслины, чем применявшиеся ранее растворы гипохлорита натрия и сулемы. Обработка сегментов побега сорта Никитская 0,3% раствором активного хлора в течение 5,5-10 минут позволила получить от 65% до 73% стерильных эксплантов. Хорошие результаты были получены при экспозиции антисептика 10 минут. Интенсивность образования эксплантами каллуса при этом режиме стерилизации была ниже и составила 32%. Плоды маслины протирали марлевой салфеткой, смоченной в 70% этаноле, обрабатывали 96% этиловым спиртом, обжигали в пламени спиртовки, после чего удаляли околоплодник и извлекали зародыш.

Для получения асептической культуры первичных эксплантов канн садовой вегетативные почки стерилизуют последовательно в 96% этаноле в течении 1 мин, в 1% растворе Thimerosal (15 мин), в растворе препарата «ДезТаб» в концентрации 0,45-0,6% в течение 20-25 мин, добавляя 2 капли детергента Tween-80. Коробочки канн садовой, обрабатывают 96% этанолом, обжигают в пламени спиртовки, после чего извлекают семена, а затем изолируют зародыш.

Стерилизация эксплантов клематиса (сегменты побегов с вегетативными почками) заключается в последовательной обработке 96% раствором этилового спирта (1 мин), 0,3% раствором хлорсодержащего препарата «Дез Таб» (7-9 мин) и погружением в 1% Thimerosal (10 мин) с добавлением 2-3 капель детергента Tween-80.

Стерилизацию сегментов побега розы миниатюрной проводят в несколько этапов. После предварительной обработки, как и в случае с эксплантами маслины у побегов срезают листья, разделяют на сегменты и помещают их в стерильные стаканы и последовательно обрабатывают растворами стерилизующих агентов. Для стерилизации используют 70% этанол, 1 мин, затем 0,15% «Дез Таб» – 15 мин, после экспозиции в растворе 0,15% «Дез Таб» промывают стерильной дистиллированной водой пять раз. В этом случае удается добиться 80-90% стерилизации эксплантов.

Для поверхностной стерилизации первичных эксплантов некоторых видов *Potentilla* L. необходимо применять следующие стерилизующие агенты: этанол ( $C_2H_5OH$ ) в концентрации 70-96% и «Дез Таб» в концентрации 0,375 – 1,125%  $Cl_2$ . Стерилизацию растительного материала проводят в несколько этапов. Семена, листья, черешки,

вегетативные почки, междуузлия, корни интактных растений промывают в мыльном растворе, затем ополаскивают в чистой водопроводной воде и немного подсушивают. Смоченной в 70% этаноле, марлевой салфеткой протирают экспланты. Подготовленный к стерилизации растительный материал перекладывают в стерильные банки или стаканы в зависимости от размера и количества эксплантов. Вегетативные почки, листья, черешки, междуузлия, корни и семена *P. depressa*, *P. canescens*, *P. recta* последовательно стерилизуют 1 мин в 70% – 96%  $C_2H_5OH$ , 7-25 мин 0,375 – 1,125%  $Cl_2$  («Дез Таб») с добавлением нескольких капель детергента Tween-80, далее промывают 10-15% раствором этанола и завершают обработку четырехкратной промывкой стерильной дистиллированной водой.

**Приготовление питательных сред.** Для культивирования эксплантов исследуемых культур используют агаризованные питательные среды Murashige, Skoog (МС, MS) [26], Monnier (Монье) [25], Пирика [28], QL [29] и WPM [23]. Питательные среды состоят из солей макро- и микроэлементов, витаминов, регуляторов роста, сахарозы, агар-агара, растворенных в дистиллированной воде (табл. 1).

Для регулирования процессов морфогенеза в питательные среды вводят регуляторы роста цитокининового – кинетин, зеатин, 6-бензиламинопуридин (БАП), тидиазурон (ТДЗ) и ауксинового –  $\alpha$ -нафтилуксусная кислота (НУК),  $\beta$ -индолилмасляная кислота (ИМК), индолилуксусная кислота (ИУК) типов действия в разных концентрациях и комбинациях (производитель – компания «Sigma», США).

После добавления углеводов измеряют pH среды, которая зависит от состава питательной среды. Доводят pH до необходимого значения с помощью 0,1 н раствора КОН или HCl. Необходимо обратить внимание на то, что после автоклавирования среды pH немного снижается (на 0,1-0,5 единиц). Показатели pH указаны в таблице 1. В процессе приготовления питательной среды отдельно в теплой воде растворяют агар-агар («Sigma», США). Для стерилизации питательных сред применяют автоклав. Условия автоклавирования сред: температура 105-110°C, давление 0,7-0,8 атм на протяжении 7-20 мин, в зависимости от объема культурального сосуда.

**Введение эксплантов в условия *in vitro*.** Экспланты вводят на модифицированные питательные среды. Индукцию развития эксплантов исследуемых растений проводят на следующих питательных средах: модифицированной среде МС, Пирика, QL, WPM – вегетативные почки, листья, сегменты побегов, верхушки растущих побегов; на модифицированной среде Монье – семена и зародыши. После стерилизации зародыши отделяют от окружающих тканей и при помощи шпателя или пинцета помещают на питательную среду. Фазу развития зародышей определяют визуально с помощью стереоскопического бинокулярного микроскопа МБС-10. Для пробуждения почек и активизации роста незрелых зародышей в питательную среду добавляют гибберелловую кислоту (ГК<sub>3</sub>, «Sigma», США) в концентрации 0,1-1,0 мг/л. Для получения оздоровленных и безвирусных растений используют ингибиторы вирусов (рибавирин и др.), которые добавляют в питательные среды на этапе введения в культуру.

Способность изолированных вегетативных почек фейхоа, киви и маслины на этапе введения в условия *in vitro* регенерировать микропобеги зависит от генотипа и концентрации цитокининов в питательной среде. Так, 0,2 мг/л и 1,0 мг/л БАП в модифицированной питательной среде МС являются эффективными для регенерации микропобегов из изолированных почек киви. Добавление в модифицированную среду МС зеатина в концентрации 0,2 мг/л индуцирует первичную регенерацию микропобегов фейхоа. Последующая регенерация микропобегов происходит на среде, дополненной 0,6 мг/л зеатина. Индукцию развития эксплантов маслины осуществляли на питательной среде WPM. Среди исследуемых сортов наибольшей способностью к

индукции морфогенеза обладали экспланты сорта Никитская. Так, частота формирования микропобегов варьировала от 16% в июле до 85% в декабре. У остальных сортов этот показатель не превышал 71%. Низкая способность к индукции побегообразования (25%) была отмечена у эксплантов сорта Крымская Превосходная.

Таблица 1

Рекомендованные составы питательных сред для размножения различных эксплантов представителей семейств *Ranunculaceae*, *Cannaceae*, *Moraceae*, *Rosaceae*, *Myrtaceae*, *Oleaceae*, *Actinidiaceae*, мг/л

Table 1

Composition of culture media for propagation of different explants in families *Ranunculaceae*, *Cannaceae*, *Moraceae*, *Rosaceae*, *Myrtaceae*, *Oleaceae*, *Actinidiaceae*, mg l<sup>-1</sup>

Компоненты	Питательная среда				
	МС	Пирика	Монье	WPM	QL
<u>Макроэлементы:</u>					
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,0	206,0	825,0	400,0	400,0
KNO <sub>3</sub>	1900,0	950,0	1900,0	-	1800,0
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	990,0	-
KCl	-	-	350,0	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,0	85,0	170,0	170,0	270,0
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O				556,0	833,8
CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	440,0	220,0	880,0	96,0	-
MgSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	370,0	185,0	370,0	-	175,8
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-	-	-	370,0	-
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	37,3	14,9	37,3	37,3
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	11,1	27,8	27,8
<u>Микроэлементы:</u>					
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2	12,4	6,2	6,2
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	-	33,6	22,3	0,75
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22,3	22,3	-	-	-
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6	21,0	8,6	8,6
KJ	0,83	0,83	1,66	-	0,08
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,5	0,025	-
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,05	0,025	0,025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,05	-	0,025
<u>Органические вещества:</u>					
Глицин	2,0	-	3,0	2,0	2,0
Мезоинозит	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Никотиновая кислота	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Пиридоксин·НС1	0,5	0,5	0,1	0,5	0,5
Тиамин·НС1	0,1	0,1	0,1	1,0	0,1
Гидролизат казеина	-	-	400,0	-	-
Сахароза	30000,0	30000,0	20000,0-30000,0	30000,0	30000,0
Агар-агар	9000,0	9000,0	9000,0	9000,0	9000,0
pH	5,7	5,5-5,6	5,6-5,8	5,6-5,7	5,2-5,4

Для индукции развития зиготических зародышей киви, фейхоа и маслины применяют их предварительную обработку в отсутствии освещения. Компетентность зиготических зародышей исследуемых культур к прорастанию зависит от продолжительности воздействия низких позитивных температур (4±1°C). Частота прорастания эксплантов на питательной среде Монье достигает 100% при предварительной обработке зародышей фейхоа и киви в течение 15 сут, маслины – 30

сут. После обработки для преадаптации экспланты переносят в климатические камеры на 1-2 сут с постепенным повышением температуры до 15°C та интенсивности освещения до 0,3 клк. В культуральной комнате, где находятся пробирки и колбы с эксплантами, поддерживают постоянную температуру воздуха 23±1°C, освещение 2-3 клк и фотопериод 16 часов.

Для индукции развития эксплантов инжира большое значение имеет состав питательной среды. На этапе веления первичных эксплантов используют питательную среду QL, дополненную 0,75-2,0 мг/л БАП. Индукцию развития эксплантов наблюдают на питательных средах QL и WPM, модифицированных для разных этапов морфогенеза инжира. В качестве индукторов морфогенеза в питательные среды добавляют регуляторы роста: БАП в концентрации 0,5-2,0 мг/л, НУК – 0,1-0,5 мг/л.

Для индукции развития эксплантов из вегетативных почек канны садовой используют модифицированную питательную среду МС. Большинство сортов канны садовой формируют недоразвитые зародыши. Культивирование *in vitro* изолированных зародышей позволяет получить полноценные растения. Для индукции прорастания зародышей их стратифицируют в условиях *in vitro* при пониженной температуре (5±1°C) и отсутствии освещения на питательной среде Монье.

На этапе введения состав среды не оказывает значительного влияния на индукцию морфогенеза у клематиса. В качестве базовой питательной среды используют среду МС, дополненную БАП в концентрации от 0,1 до 0,5 мг/л.

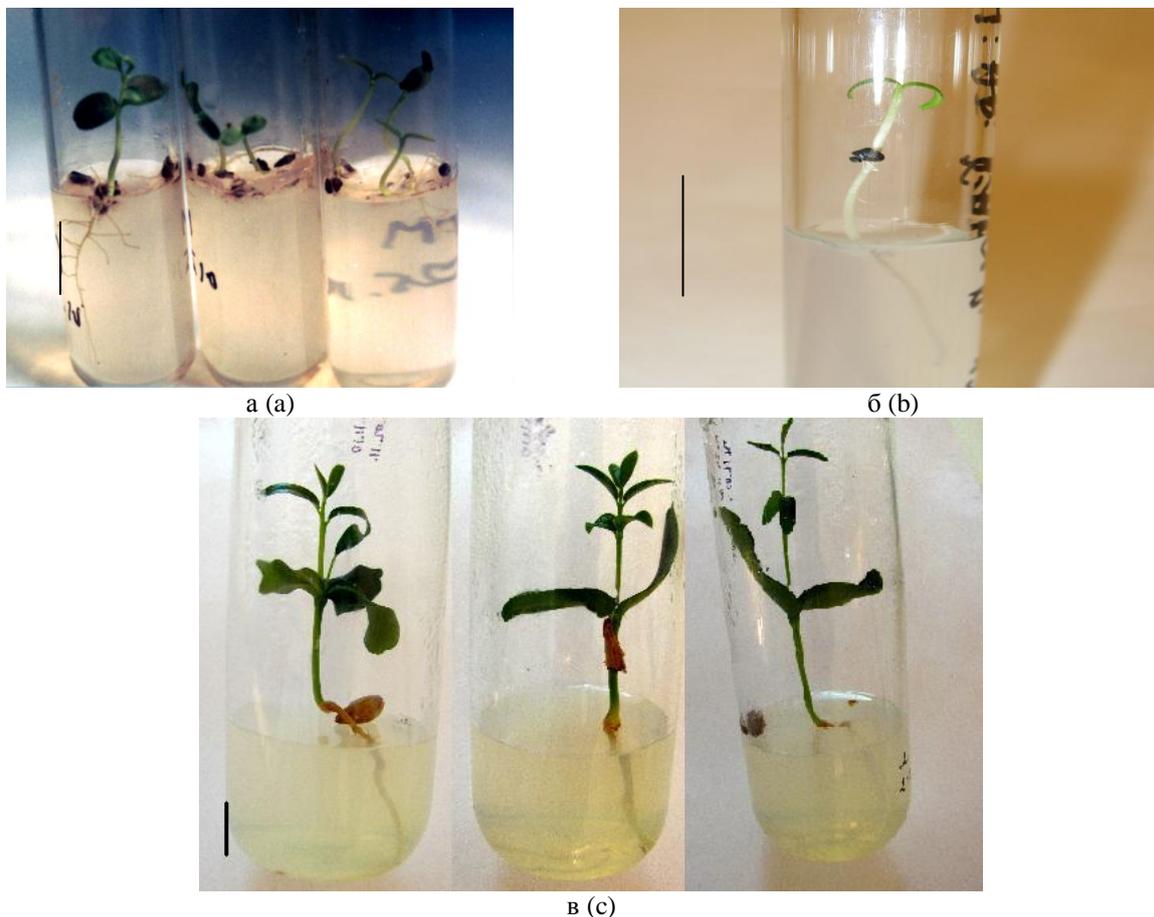
У розы миниатюрной экспланты, прошедшие стерилизацию в асептических условиях, помещают в пробирки на агаризованную питательную среду. В качестве базовой среды используют среду МС (рН 5,7), с добавлением БАП в концентрации 0,25 или 0,5 мг/л.

Индукция развития эксплантов некоторых видов лапчаток происходит на модифицированных средах MS, Pierik и Monnier, дополненных БАП, кинетином, ИМК и НУК. Семена *P. recta* культивируют на питательных средах Монье и МС, дополненной 0,5 мг/л БАП и 0,01 мг/л НУК. Для прорастания семян пробирки с ними помещают на стратификацию в условия холодильной камеры без освещения (4±1°C). На 20-30 сут культивирования их переносят в культуральную комнату с температурой 24±1°C, 16-часовым фотопериодом, интенсивностью освещения 2-3 клк и относительной влажностью 70%.

**Прямая и непрямая регенерация растений.** На данном этапе получают максимальное количество микропобегов путем индукции образования адвентивных почек. Этот процесс, как правило, происходит на модифицированных питательных средах МС, Пирика, QL и WPM. Среда содержат в своем составе разные регуляторы роста: цитокинины (кинетин, зеатин, БАП, ТДЗ) и ауксины (НУК, ИМК, ИУК, 2,4-Д).

**Культура семян и зародышей.** Семена и зародыши исследуемых культур объединяют в группы по размерам. У субтропических культур, таких как киви, фейхоа и маслина после непродолжительной стратификации (15-30 суток) семена или зародыши перемещают в культуральную комнату с освещением. Их культивируют на питательной среде Монье. В течение первой недели зародыши изменяют свою окраску от белого до зеленого. У фейхоа и киви отмечают 100% прорастание зародышей и семян. Регенерация идет поэтапно: сначала развиваются корни, а потом происходит формирование проростка (рис. 5 а, б). Из зрелых зародышей киви и фейхоа в условиях *in vitro* на протяжении 2-3 месяцев формируются полноценные растения. Недоразвитые зародыши и проростки киви с различными морфологическими отклонениями культивируют на модифицированной среде МС, содержащей 0,5-1,0 мг/л БАП, что индуцирует развитие аксилярных меристем и рост микропобегов. Развитие зародышей маслины идет по пути формирования полноценных проростков. На седьмой неделе

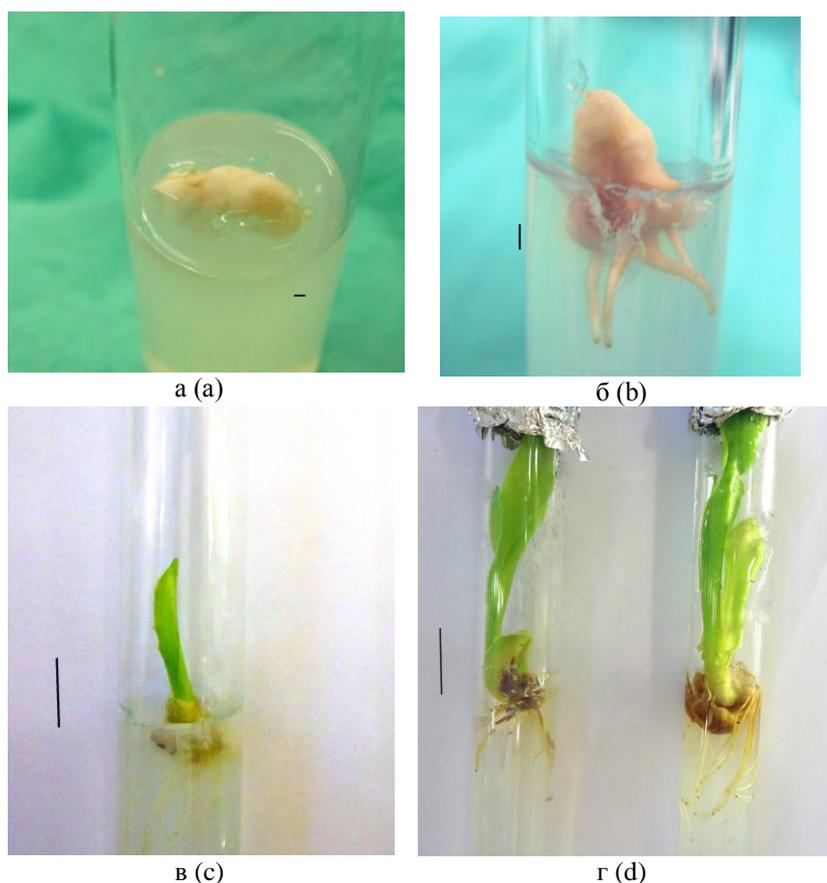
культивирования у 75-100% зародышей появляются зародышевые корешки. После этого происходит полное раскрытие семядолей в течении 4-6 сут, а появление первой пары настоящих листьев – через 7-10 сут после выставления пробирок с проростками на свет. Растения, полученные через культуру зародышей, материнскими формами которых были сорта Обильная и Никитская, отличаются быстрым развитием и спустя 3,5 месяца от начала эксперимента имеют по 3-4 пары настоящих листьев, основной корень и массу корешков второго и третьего порядка (рис. 5 в).



**Рис. 5** Развившиеся проростки в условиях *in vitro*: а) из семян киви; б) из семени фейхоа; в) из зародышей маслины (масштаб 1 см)

**Fig. 5** Seedlings developed *in vitro*: а) from seeds of kiwi; б) from seed of feijoa; в) from embryos of olive (Bar 1 cm)

У изолированных из семени зародышей канны садовой сорта Дар Востока на 8-е сутки культивирования происходит разрастание тканей (рис. 6 а). На 21-е сут культивирования у некоторых изолированных зародышей развиваются корни (рис. 6 б). Через 60 суток культивирования при  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ , в темноте изолированные зародыши с развившимися корнями переносят в стандартные условия с температурой  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ , 16-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 2-3 клк. На 2-е сутки культивирования в условиях освещения экспланты изменяют свою окраску от светло-бежевого до зеленого, на 6-8 сутки культивирования у зародышей происходит выдвижение первого листа (рис. 6 в). Наряду с этим, у развившихся из зародышей проростков и растений в стандартных условиях культивирования увеличивается количество корней (до 11 шт. на эксплант) и их длина (до 3-5 см). После стратификации (60 сут) на 35-е сут культивирования в стандартных условиях развиваются полноценные проростки сорта Дар Востока с хорошо развитыми корнями и 2-3 развернувшимися листьями (рис. 6 г).



**Рис. 6** Прямой органогенез из зародышей канны садовой сорта Дар Востока: а) зародыш на питательной среде Монье; б) рост корней у зародыша (масштаб 1 мм); в) развитие зародышей канны при культивировании в стандартных условиях на 6-8 сутки; г) на 30-е сутки (масштаб 1 см)  
**Fig. 6** Direct organogenesis of embryos in *Canna* cultivar Dar Vostoka: a) embryo on Monnier culture medium; b) the roots growth of embryo (Bar 1 mm); c) embryos of *Canna* development under standard conditions (at 6-8 days); d) embryos development at 30 day (Bar 1 cm)

Пробирки с семенами *P. recta* помещают на стратификацию в условия холодильной камеры без освещения ( $4\pm 1^\circ\text{C}$ ). На 20-30 сут культивирования их переносят в культуральную комнату с температурой  $24\pm 1^\circ\text{C}$ , 16-часовым фотопериодом, интенсивностью освещения 2 - 3 клк и относительной влажностью 70%. В этих условиях из семян на среде Монье и МС образуются проростки (рис. 7).



**Рис. 7** Развитие проростков из семян *P. recta* на питательной среде Монье (масштаб 1 см)  
**Fig. 7** Seedlings development from *P. recta* seeds on Monnier culture media (Bar 1 cm)

**Культура высечек листа и сегментов побега.** Среди эксплантов, вводимых в культуру *in vitro*, особый интерес представляет лист. Лист, в отличие от других органов растений, в изолированных условиях развивается таким же образом, как и на интактном растении. Это является доказательством того, что лист представляет собой самодифференцирующийся орган и может быть прекрасным объектом как для фундаментальных исследований морфогенетических процессов, так и для практического применения этих знаний в массовом размножении растений. Высечки листа вычлняют из листьев исследуемых растений, которые культивируются в условиях *in vitro*.

Экспланты киви (листовые диски диаметром 1,0 см или высечки листа размером 1x1 см с черешком) размещают абаксиально и адаксиально на питательные среды, которые содержат половинную концентрацию макро- и микросолей. Вместе с тем в среды добавляют витамины по прописи МС, БАП та ИУК. Растительный материал в культуральных сосудах помещают в условия с температурой  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 16 часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 2-3 клк. В случае использования среды, содержащей только БАП на эксплантах листа формируется неморфогенный каллус светло-зеленой окраски. Добавление в среду ИУК индуцирует образование каллуса и дальнейшее корнеобразование. Комбинация разных концентраций БАП и ИУК в среде дает возможность индуцировать регенерацию многочисленных микропобегов.

Важным является установление зависимости регенерационного потенциала листовых эксплантов от их размещения на поверхности питательной среды. Оптимальные концентрации БАП (2,0 мг/л) и ИУК (1,5 мг/л) дают возможность индуцировать образование адвентивных микропобегов *A. deliciosa* после 8 недель культивирования эксплантов при их абаксиальном расположении. Уменьшение или увеличение концентрации регуляторов роста значительно снижает частоту регенерации растений. Комбинация концентраций БАП и ИУК оказывает значительное влияние на регенерационный потенциал листовых эксплантов нескольких сортов киви при их адаксиальном расположении на питательной среде. Высокую частоту регенерации микропобегов имеют экспланты сорта Сааништон и гибрид Аббот x Томури, которая достигает 100% (рис. 8).



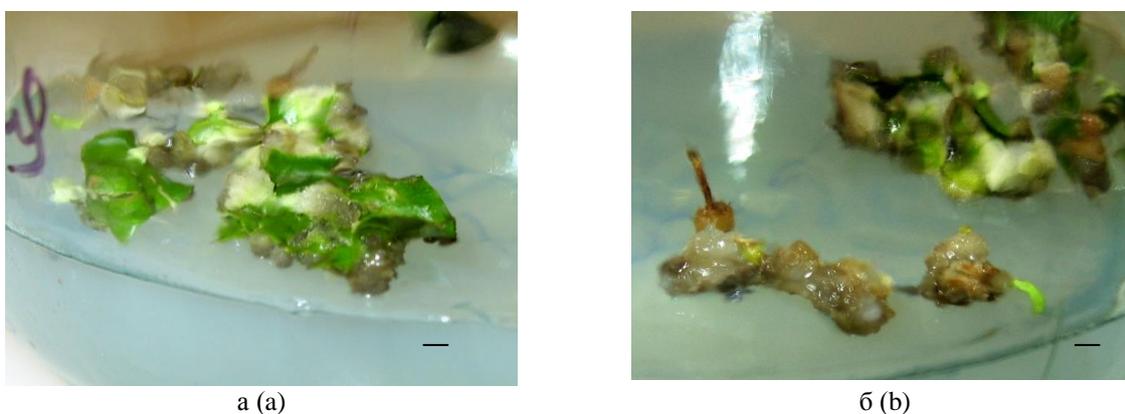
**Рис. 8** Регенерация адвентивных микропобегов из листовых дисков киви сорта Сааништон (масштаб 1 см)

**Fig. 8** Adventive microshoots regeneration from leaf discs of kiwi cv. Saanishton (Bar 1 cm)

Активную регенерацию микропобегов из листовых эксплантов и сегментов побега киви и фейхоа можно индуцировать на среде ТДЗ. Известно, что этот регулятор роста индуцирует процессы морфогенеза и регенерацию микропобегов в условиях *in vitro* у большинства древесных растений [21, 22]. Использование ТДЗ в концентрации от 0,2 мг/л до 1,9 мг/л для прямой и непрямой регенерации микропобегов дает возможность индуцировать развитие микропобегов из листовых эксплантов и сегментов побега

фейхоа и киви. Вегетативные почки и микропобеги киви формируются главным образом у основания черешка на среде с 0,2 мг/л ТДЗ.

Нашими исследованиями показано, что экспланты листа фейхоа не были способны к регенерации микропобегов на вариантах сред с НУК + БАП и ИУК + БАП. Отмечали только образование неморфогенного каллуса рыхлой консистенции серо-коричневой окраски. Признаки индукции каллусообразования в культуре эксплантов листа можно наблюдать на 15-18 сут культивирования на средах с 0,6 мг/л и 3,2 мг/л ТДЗ. Формирование каллуса на сегментах микропобегов начинается на поверхности среза. На листовых эксплантах каллус образуется по периметру листа, в местах поранения и на черешках (рис. 9). Присутствие в среде 1,3 – 2,5 мг/л ТДЗ индуцировало органогенез у 45% стеблевых эксплантов фейхоа сорта Никитская Ароматная и 40% – формы Ф2. В процессе изучения особенностей регенерации растений из высечки листа было установлено, что при изменении концентрации 2,4-Д от 1,5 до 3,0 мг/л у 96% эксплантов морфогенетический потенциал реализовался через каллусогенез.



**Рис. 9 Морфогенный и неморфогенный каллус, полученный из эксплантов листа и сегментов микропобега фейхоа сорта Никитская Ароматная и гибридной формы Ф2 после 30 суток культивирования (масштаб 1 мм)**

**Fig. 9 Morphogenic and non-morphogenic callus obtained from leaf explants and microshoot segments of feijoa cv. Nikitskaya Aromatnaya and hybrid form F2 after 30 days of culture (Bar 1 mm)**

Индукцию прямого и непрямого органогенеза отмечали в культуре эксплантов листа практически у всех исследуемых сортов инжира на средах с ТДЗ. Однако количество развившихся высечек листа по пути непрямого органогенеза было значительно больше и достигало показателя 70% (рис. 10).

Изучение регенерационной способности листовых эксплантов канны показало, что высечки листа этого растения обладают низким морфогенетическим потенциалом. Так, при культивировании высечек листа наблюдали потемнение некоторых эксплантов на 21-е сут культивирования и их некротизацию. При этом, сегменты черешка листа сохраняют жизнеспособность длительный период (до 45 сут), по сравнению с высечками из листовой пластинки (до 35 сут).

Исследуя морфогенетический потенциал клематиса в условиях *in vitro*, высечки листа с черешками помещают на поверхность модифицированной питательной среды МС. На этой среде отмечают индукцию каллусогенеза. В экспериментах были использованы экспланты сортов Алёнушка, Алёша, Mrs Cholmondeley, Nelly Moser и Madam le Coultre. При культивировании эксплантов на среде с концентрацией БАП 0,3-0,7 мг/л каллус не формируется. Дополнение среды веществом цитокининового типа действия (ТДЗ) способствует образованию неморфогенного бледно-желтого каллуса, почти белой окраски на черешках и вдоль жилок листьев сорта Алёша. Под влиянием 2,0 мг/л 2,4-Д заметно повышается морфогенный потенциал у сорта Nelly Moser и



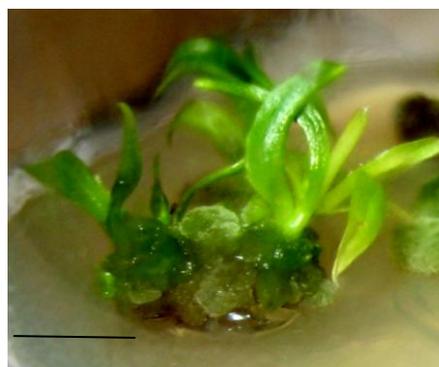
Рис. 10 Индукция каллусогенеза и прямого органогенеза в культуре листовых эксплантов инжира на питательной среде с 2,0-2,5 мг/л ТДЗ

Fig. 10 Callusogenesis and direct organogenesis induction in leaf explants culture of fig on media with 2,0-2,5 mg l<sup>-1</sup> TDZ

активно нарастает бледно-серый каллус. Через 25 суток культивирования из верхней части эксплантата развиваются корни (1-2 шт.), при этом образования микропобегов не отмечено (рис. 11 а). Среди исследуемых сортов наиболее отзывчивым к действию регуляторов роста оказался сорт Алёнушка. На средах, дополненных БАП (1,5 мг/л) и НУК (1,8 мг/л), или 1,5 мг/л 2,4-Д из нижней части каллуса развиваются корни (3-4 шт.) длиной 1,8-6,7 см (рис. 11 б).



а (а)



б (б)

Рис. 11 Непрямое корнеобразование в культуре листовых эксплантов клематиса у сорта Nelly Moser (а) и регенерация микропобегов в каллусе сорта Алёнушка (б) (масштаб 1 см)

Fig. 11 Indirect rhizogenesis in leaf explants of Clematis cv. Nelly Moser (a) and microshoots regeneration from callus of cv. Alenushka (b) (Bar 1 cm)

Непрямая регенерация микропобегов отмечена у *P. recta* и *P. canescens*. При использовании в качестве экспланта междоузлий *P. recta* на среде МС с 0,2 – 0,6 мг/л кинетина и 0,8 – 1,2 мг/л НУК удастся индуцировать непрямую регенерацию микропобегов: на 25 – 30 сут начинает образовываться эмбриогенный каллус, который представляет собой скопление стекловидных прозрачных глобул менее 1 мм в диаметре (рис. 12 а). На 55-60 сут из каллуса регенерируют микропобеги, которые в течение недели достигают размеров 0,8 – 1 см. Культивирование высечек листа *P. canescens* на

питательной среде МС с добавлением 0,1 мг/л кинетина способствует образованию эмбрионного каллуса на 25-35 сут, а затем на 50-60 сут – регенерации микропобегов из него (рис. 12 б).



Рис. 12 Формирование эмбрионного каллуса в культуре листовых дисков *P. recta*, масштаб 1 мм (а) и регенерация микропобегов в каллусе листового происхождения *P. canescens*, масштаб 1 см (б)  
 Fig. 12 Embryogenic callus formation in leaf discs culture *P. recta*, Bar 1 mm (a) and microshoots regeneration from leaf origin calli *P. canescens*, Bar 1 cm (b)

**Культура вегетативных почек.** Вегетативные почки как первичный эксплант чаще всего используются для индукции регенерации растений, особенно если целью исследования или разработки является получение генетически однородного растительного материала конкретного вида или сорта. Вместе с тем основным требованием при введении первичного экспланта в условия *in vitro* должно быть отсутствие фитопатогенов, что обычно достигается поверхностной стерилизацией одним или несколькими стерилизующими агентами, описанными нами в подразделе «Стерилизация растительного материала». Для некоторых взрослых растений, выращиваемых в открытом грунте, такая обработка не всегда пригодна вследствие проникновения в растительные ткани микроорганизмов, распространяющихся по сосудистой системе. Заражение эндогенными бактериями *Aerococcus* spp. и *Bacillus fastidiosus* практически трудно устранить у таких культур как канна, киви, клематис и других. В этом случае для стерилизации эксплантов применяют антибиотики и системные фунгициды.

Известно, что в тех случаях, когда у растений развивается только главный побег, для индукции роста пазушных побегов необходимо снять апикальное доминирование. Степень выраженности апикального доминирования является наследственным признаком и связана с гормональным балансом в различных органах растения, транспортом фитогормонов и снабжения почек трофическими факторами.

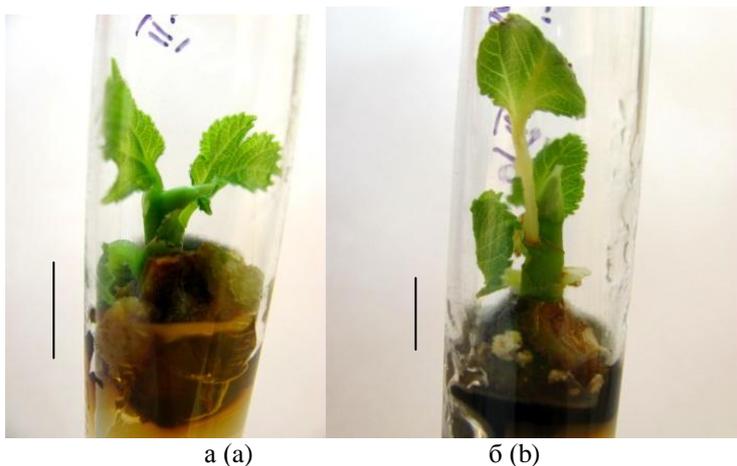
Кинетин во всех используемых концентрациях (0,2 – 2,0 мг/л) замедляет регенерацию микропобегов у киви и фейхоа, и активизирует нарастание каллуса в базальной части вегетативной почки. 1,0 мг/л БАП является наиболее эффективной концентрацией для регенерации микропобегов из изолированных почек киви. Первичную регенерацию микропобегов фейхоа индуцируют путем культивирования вегетативных почек фейхоа на питательной среде МС, дополненной 0,1 мг/л зеатина. Дальнейшая регенерация микропобегов этой культуры происходит на среде с 1,0 мг/л зеатина (рис. 13).

Для индукции развития эксплантов инжира применяли питательную среду WPM в нашей модификации, которая часто применяется для размножения древесных растений. После стерилизации изолированные вегетативные почки очищают от покровных тканей и только затем помещают на питательную среду. Из эксплантов 6 сортов инжира, введенных в условия *in vitro* в весенний период, были жизнеспособны и

успешно развиваются в культуре *in vitro* микропобеги 5 сортов (83,3%), тогда как из эксплантов 13 сортов, введенных в летний период, активно развиваются микропобеги только 6 сортов (46,2%). У вегетативных почек после введения в асептические условия на 1-2 неделе культивирования было отмечено выдвижение листьев, а на 3-4 неделе у отдельных сортов вытягивались микропобеги (рис. 14).

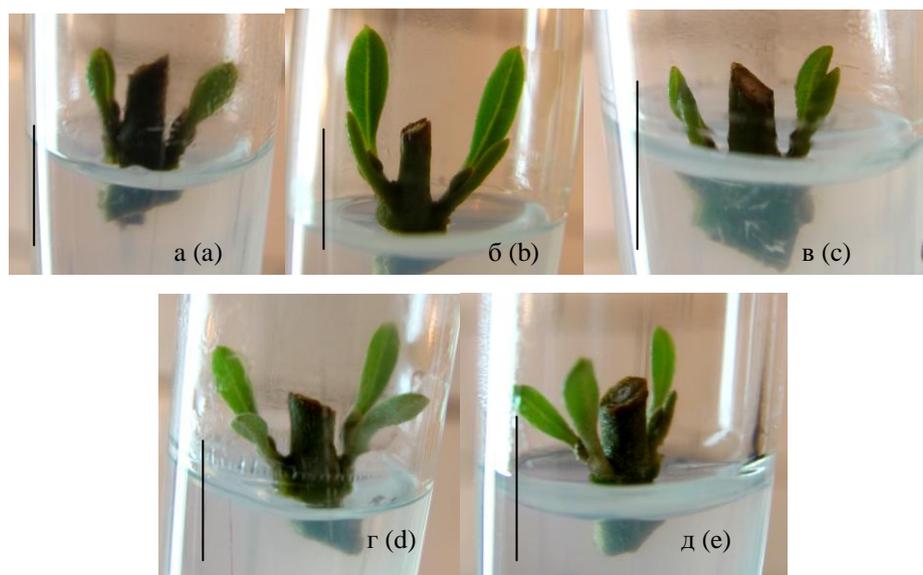


**Рис. 13** Регенерация микропобегов фейхоа сорта Никитская Ароматная после 8 недель культивирования на питательной среде МС с зеатином (масштаб 1 см)  
**Fig. 13** Microshoots regeneration of feijoa cv. Nikitskaya Aromatnaya after 8 weeks of culture on MS medium with zeatin (Bar 1 cm)



**Рис. 14** Раздвижение листьев у вегетативных почек инжира в первую неделю культивирования (а) и развитие микропобега на 14-21 сутки в условиях *in vitro* (б), масштаб 1 см  
**Fig. 14** Leaf out of Fig vegetative buds at the first week of culture (a) and microshoots development at 14-21 hours under conditions *in vitro* (b), Bar 1 cm

У эксплантов маслины сорта Никитская, обработанных разными стерилизующими агентами, в течение четырёх недель культивирования на среде WPM не выявлялось существенное различие в скорости роста микропобегов из вегетативных почек, находящихся на вводимых в условия *in vitro* сегментах побегов (рис. 15). Однако на пятой неделе культивирования в варианте опыта с сулемой происходит отделение микропобегов от основного экспланта и отмирание эксплантов вследствие интенсивного нарастания каллуса. Каллус у маслины рыхлый, полупрозрачный, жёлтой или светло-зелёной окраски, формируется в местах среза или отделения листового черешка. В варианте с гипохлоритом натрия микропобеги продолжают нормально развиваться без образования или с образованием незначительного количества каллуса, и спустя 6 недель с момента введения эксплантов в условия *in vitro* они достигают в среднем длины  $0,67 \pm 0,08$  см.

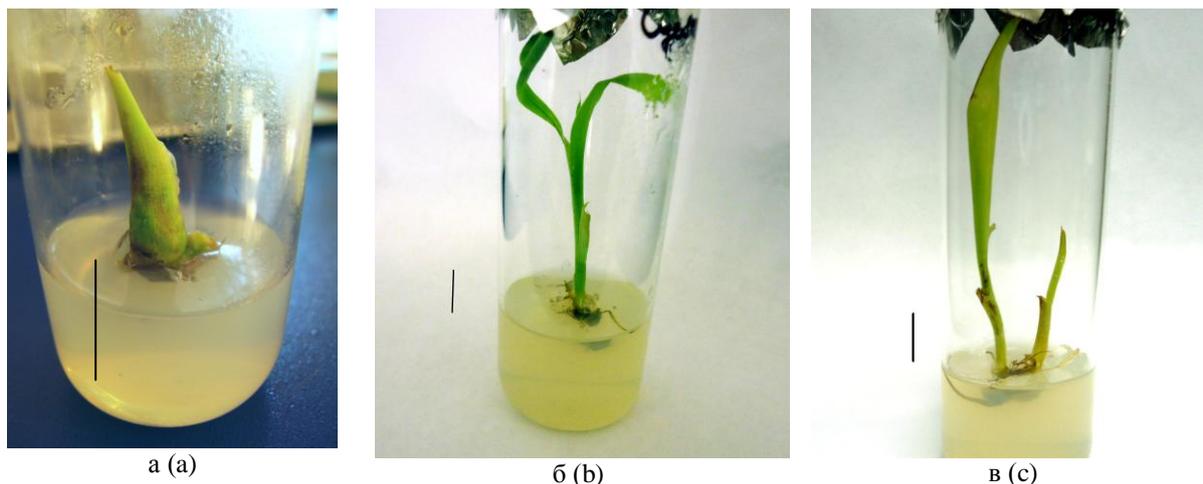


**Рис. 15** Экспланты сортов Ломашенская (а), Толгомская (б), Крымская Превосходная (в), Никитская (г) и Никитская Крупноплодная (д) спустя 3 недели культивирования на среде WPM (масштаб 1 см)  
**Fig. 15** Explants of cvs. Lomashenskaya (a) Tolgomskaya (b), Krimskaya Prevoshodnaya (c), (d) and Nikitskaya Krupnoplodnaya (e) after 3 weeks of culture on WPM medium (Bar 1 cm)

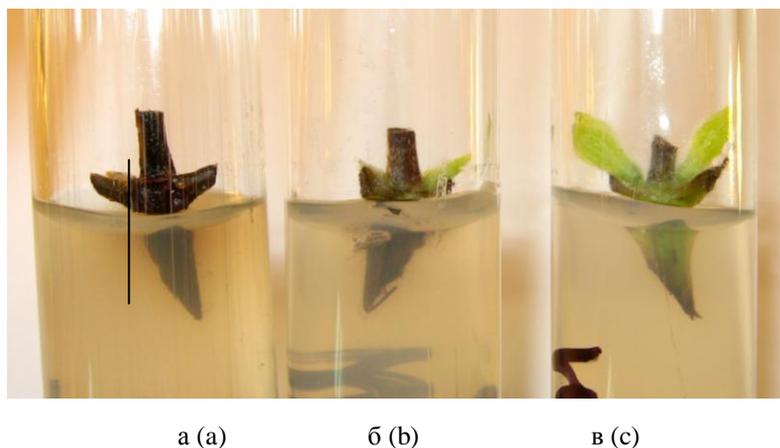
Среди факторов, оказывающих влияние на регенерацию микропобегов канны садовой на начальном этапе культивирования, важную роль играет генотип исходного растительного материала. Так, использование питательной среды МС, дополненной 2,0 – 4,0 мг/л БАП и 1 мг/л ГК<sub>3</sub> при культивировании канны садовой сорта Ливадия способствует образованию 2 развернутых листьев и увеличение длины эксплантов на 0,75 см. Однако, на 30-е сут культивирования края образовавшихся листьев начинают темнеть и деформироваться. Экспланты сорта Суевия начинают удлиняться на 10-е сутки культивирования, на 35 сут – длина вегетативных почек достигает 3 см (рис. 16 а, б). В более поздние сроки культивирования в условиях *in vitro* (65-е сут) у отдельных эксплантов сорта Суевия появляются дополнительные побеги. У микропобегов канны садовой, сохранивших жизнеспособность на 90-е сут культивирования, формируется 1,25 дополнительных побегов на эксплант. Спустя 6 месяцев культивирования в условиях *in vitro* количество образовавшихся адвентивных побегов на эксплант увеличивается до 1,6. Однако, при последующем культивировании этот показатель остается неизменным. Вместе с тем, при культивировании *in vitro* у эксплантов сорта Суевия длина адвентивных микропобегов увеличивается до 5,5-7 см (рис. 16 в).

Для индукции регенерации первичных эксплантов клематиса используется половинная концентрация макросолей в питательной среде МС и БАП в концентрации 0,1 – 0,2 мг/л. Развитие микропобегов из вегетативных почек, находящихся в пазухах сегмента побега, индуцируется на среде Clem – модифицированная среда МС (рис. 17). Экспланты быстро удлиняются, формируя по 1-3 междоузлия, постепенно раскрываются листья. В зависимости от сроков культивирования и генотипа растения в течение 45-60 суток длина микропобегов может достигать от 0,3-0,8 см (август, осенние месяцы) до 0,7-2,2 см (весенние месяцы, июнь-июль).

Из вегетативных почек розы миниатюрной, введенных в культуру *in vitro* в весенние месяцы, через 3-4 недели происходит образование адвентивных микропобегов и листьев; в основании часто формируется каллус светло-зеленой окраски, при этом угнетение развития эксплантов не отмечают. У первичных эксплантов, введенных в условия *in vitro* в летние месяцы, отмечена активная регенерация адвентивных микропобегов на 12 сутки культивирования.



**Рис. 16** Регенерация растения из вегетативной почки у канны садовой сорта Суевия: а) развитие вегетативной почки на 7-е сутки культивирования; б) формирование растения на 35-е сутки культивирования; в) адвентивное побегообразование (масштаб 1 см);  
**Fig. 16** Plant regeneration from vegetative bud of *Canna* cv. *Sueviya*: а) the development of vegetative bud at 7th day of cultivation; б) the formation of plant at 35th day of cultivation; в) adventitious shoot formation (Bar 1 cm)



**Рис. 17** Развитие первичных эксплантов клематиса сорта Юность: а) через сутки после введения; б) через 3 суток; в) через 7 суток культивирования (масштаб 1 см)  
**Fig. 17** The development of primary explants in *Clematis* cv. *Yunosty*: а) the day after the introduction; б) at 3 days; в) after 7 days of culture (Bar 1 cm)

Вместе с тем, у эксплантов розы миниатюрной, введенных в условия *in vitro* в осенние месяцы, образование листьев происходит через 2-4 недели культивирования. У некоторых сортов (Крымский Гном и Беби Бантинг) из вегетативных почек развиваются также адвентивные микропобеги, их количество достигает в среднем 10 шт./эксплант. В декабре отмечено высокая степень инфицирования первичных эксплантов. В летние месяцы активно развивались экспланты у таких сортов как Синдерелла (94%), Цверкениг (80%), Попкорн и Мистер Блюбёрд (78%). Образование каллуса светло-зеленой окраски происходит у таких сортов как Беби Бантинг, Мандарин, Цвёркёниг, Попкорн, Рулети, Синдерелла, при этом угнетение развития эксплантов не отмечено. В осенние месяцы более 80% эксплантов развивается у таких сортов как Рулети (80%), Мистер Блюбёрд (85%), Цвёркёниг (87%), Гранатовый Браслет (88%). В это время каллус светло-зеленой окраски формируется у сортов Мальчик-с-пальчик, Цвёркёниг, Бигуди, Мистер Блюбёрд, но не угнетает их дальнейшее развитие. Высокий процент развившихся эксплантов отмечен у сортов роз, введенных в культуру *in vitro* с мая (82%) по ноябрь (72%) (рис. 18).

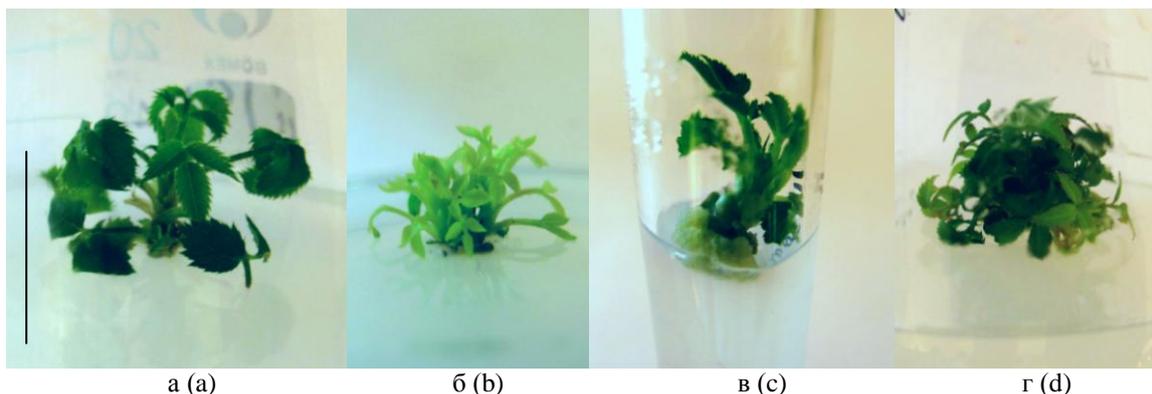


Рис. 18 Развитие микропобегов из вегетативных почек сортов розы миниатюрной: а) Гранатовый Браслет, б) Мальчик-с-пальчик, в) Мандарин; Рулети (масштаб 1 см)

Fig. 18 Microshoots development from vegetative buds of *Rosa minima* cultivars: a) Granatoviy Braslet, b) Malchik-s-palchik, c) Mandarin, d) Roulette (Bar 1 cm)

Развитие вегетативных почек *P. depressa*, *P. recta*, *P. canescens* зависит от генотипа и концентрации цитокининов. Для индукции регенерации микропобегов из вегетативных почек *P. canescens* используют среду МС, дополненную 0,5 мг/л БАП и 0,01 мг/л НУК. На третью неделю культивирования на данной среде из экспланта формируется 3-4 микропобега. Культивирование вегетативных почек *P. depressa* и *P. recta* на питательной среде МС, содержащей 0,1 мг/л кинетина или 0,4 – 0,8 мг/л БАП и 0,05 – 0,1 мг/л ИМК, индуцирует образование 4 – 6 микропобегов на эксплант (рис. 19).

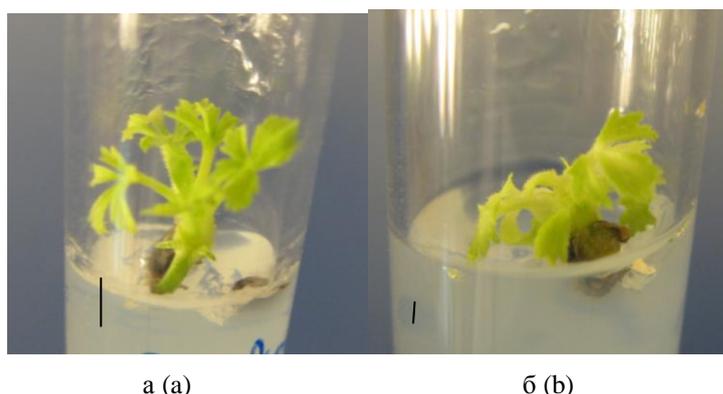


Рис. 19 Развитие микропобегов *P. depressa* (а) и *P. canescens* (б) на питательной среде МС, дополненной 0,1 мг/л кинетина или 0,5 мг/л БАП и 0,01 мг/л НУК (масштаб 1 мм)

Fig. 19 Microshoots of *P. depressa* (a) and *P. canescens* (b) development on MS culture medium with 0,1 mg l<sup>-1</sup> or 0,5 mg l<sup>-1</sup> and 0,01 mg l<sup>-1</sup> NAA (Bar 1 mm)

**Собственно микроразмножение.** Этап собственно микроразмножения служит для максимального увеличения потенциала размножения того или иного вида или сорта растения. От частоты регенерации микропобегов и коэффициента микроразмножения зависит эффективность разрабатываемого биотехнологического метода. Как и на предыдущих этапах важным является состав питательной среды, концентрация регуляторов роста, температура и освещенность.

Для регенерации дополнительных микропобегов исследуемых субтропических плодовых культур их черенкуют и помещают на модифицированную питательную среду МС, дополненную различными концентрациями БАП и зеатина.

Так, адвентивное побегообразование у эксплантов киви происходит при концентрации БАП 0,2 – 1,0 мг/л (рис. 20 а). Культивируя микрочеренки киви сорта Сааништон на среде с 1,0 мг/л БАП, из их базальной части можно получить среднее количество адвентивных микропобегов равное  $4,5 \pm 0,1$  шт. / эксплант. Множественное

побегообразование фейхоа происходит только в присутствии 0,7 мг/л зеатина (рис. 20 б). Позитивное влияние на коэффициент размножения фейхоа имеют тиамин-НСI и аскорбиновая кислота. В процессе каждого субкультивирования от эксплантов киви и фейхоа отделяют некротизированные ткани.



Рис. 20 Регенерация адвентивных микропобегов у киви (а) и фейхоа (б) в условиях *in vitro* (масштаб 1 см)

Fig. 20 Kiwi (a) and Feijoa (b) adventitious microshoots regeneration *in vitro* (Bar 1 cm)

Получение максимального количества микропобегов инжира достигается на этапе собственно микроразмножения путем индукции образования адвентивных почек на питательной среде WPM, дополненной БАП в концентрации 0,5 – 2,0 мг/л, НУК – 0,1 – 0,5 мг/л при pH 5,6-5,7. При отделении микропобегов от основного экспланта и их пассаже на свежеприготовленные среды количество микропобегов увеличивается и через 3 месяца достигает у сортов Сабруция Розовая показателя 1:17, Смена – 1:15, Финиковый – 1:15 (рис. 21). Самый высокий коэффициент размножения – 1:25 отмечен у сорта Янтарный. У остальных исследуемых сортов коэффициент размножения в условиях *in vitro* не превышал 1:10.

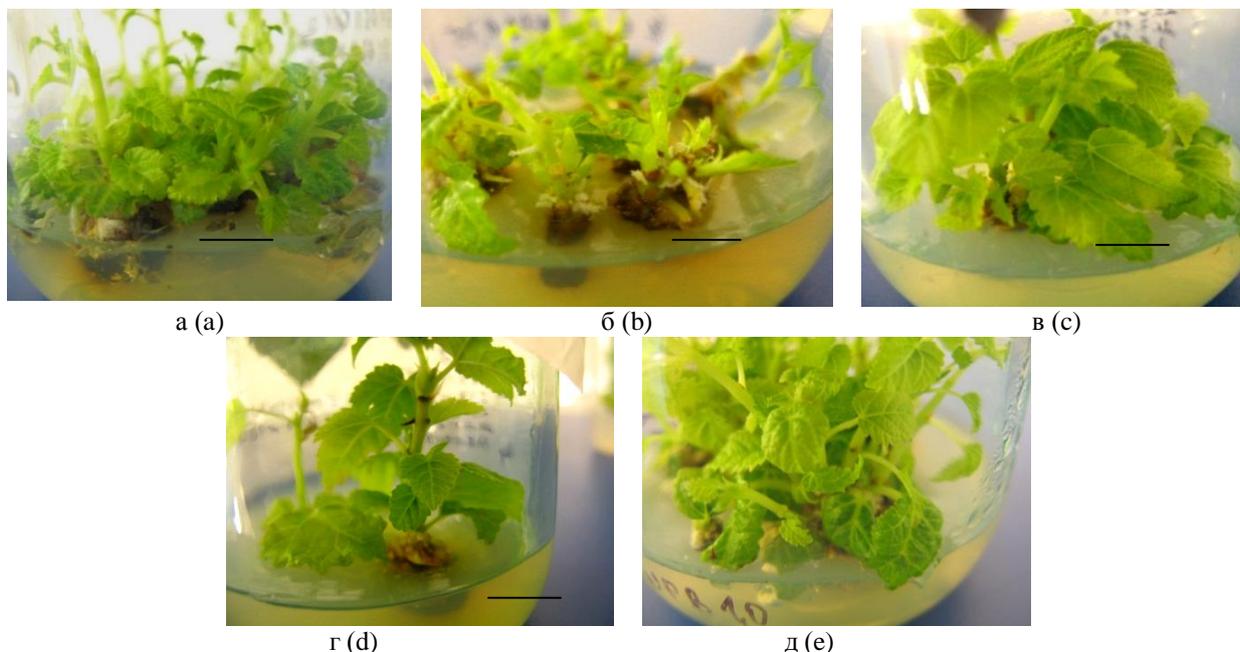


Рис. 21 Образование множественных микропобегов у некоторых сортов инжира: а) Смена, б) Желтоплодный, в) Сабруция Розовая, г) Белый Ранний, д) Лимонно-Желтый (масштаб 1 см)  
Fig. 21 Multiple microshoots formation of some cultivars of figs: a) Smena, b) Zheltoplodniy, c) Sabrucia Rozovaya, d) Belyy Ranniy, e) Limonno-Zheltiy (Bar 1 cm)

Фенольные вещества, которые выделяются эксплантами клематиса, ингибируют рост пазушных микропобегов. Частое субкультивирование (каждые 15-20 сут) препятствует негативному воздействию этих веществ на регенерацию эксплантов. Полученные микропобеги спустя 6 недель с момента введения в культуру *in vitro* черенкуют на сегменты длиной 0,3-1,0 см с разным количеством междоузлий и субкультивируют на свежеприготовленную питательную среду. Верхушки микропобегов с 2-3 листьями, а также сегменты длиной до 0,5 см с 1 междоузлем и 2 листьями погибают спустя 2 недели после субкультивирования. Вместе с тем характерной особенностью эксплантов длиной 0,5-1,0 см, имеющих 2-4 междоузлия и не менее 4 листьев, является 100% жизнеспособностью. У эксплантов сортов Mrs Cholmondeley, Ville de Lyon, Madam le Coultre на модифицированной питательной среде МС, дополненной 0,5 – 0,8 мг/л БАП активно формируются дополнительные микропобеги. Остальные сорта реализуют свой регенерационный потенциал при концентрации БАП 0,2 – 0,6 мг/л (рис. 22).



Рис. 22 Активная регенерация микропобегов у сортов клематиса Multi Blue (а) и Аленушка (б)  
 Fig. 22 Active regeneration of microshoots of Clematis cvs. Multi Blue (a) and Alenushka (b)

Для активной регенерации дополнительных побегов культивируемые *in vitro* микропобеги канны садовой сортов Дар Востока и Суевия помещают на среду МС, дополненную 1,3 мг/л ТДЗ. Это стимулирует образование адвентивных почек и микропобегов на 12-е сутки культивирования. При длительном культивировании канны садовой сорта Суевия (150 сут и субкультивировании каждые 30 сут на свежеприготовленную питательную среду) возможно получить до 7 адвентивных побегов на эксплант (рис. 23 а). В базальной части некоторых микропобегов сорта Суевия способны формироваться «протокормоподобные структуры» (меристемойды) зеленой и светло-бежевой окраски в среднем 5-10 шт./эксплант (рис. 23 б, в). Использование концентрации 1,9 мг/л ТДЗ на 120 сут культивирования микропобегов сорта Ливадия индуцирует образование 11 меристемойдов/эксплант (рис. 23 г). Однако применение 1,9 мг/л ТДЗ не вызывает последующей регенерации этих меристемойдов. Поэтому их переносят на питательную среду MS, дополненную 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК для вытягивания микропобегов. Получение меристемойдов значительно повышает эффективность клонального микроразмножения растений канны.

При культивировании эксплантов розы миниатюрной на питательных средах с различной концентрацией БАП, через три недели развития происходит образование конгломератов микропобегов (до 10 адвентивных микропобегов в конгломерате) у сортов Рулети и Цвёркёниг на среде с концентрацией БАП 1,5 мг/л (контроль); высокий процент образования конгломератов микропобегов у сорта Мандарин отмечают на среде с концентрацией БАП 3,0 мг/л. Через 6 недель культивирования все экспланты сортов

Бигуди и Беби Бантинг формируют конгломераты микропобегов. Максимальное количество (16 шт.) образуется на среде с концентрацией БАП 3,0 мг/л (рис. 24).

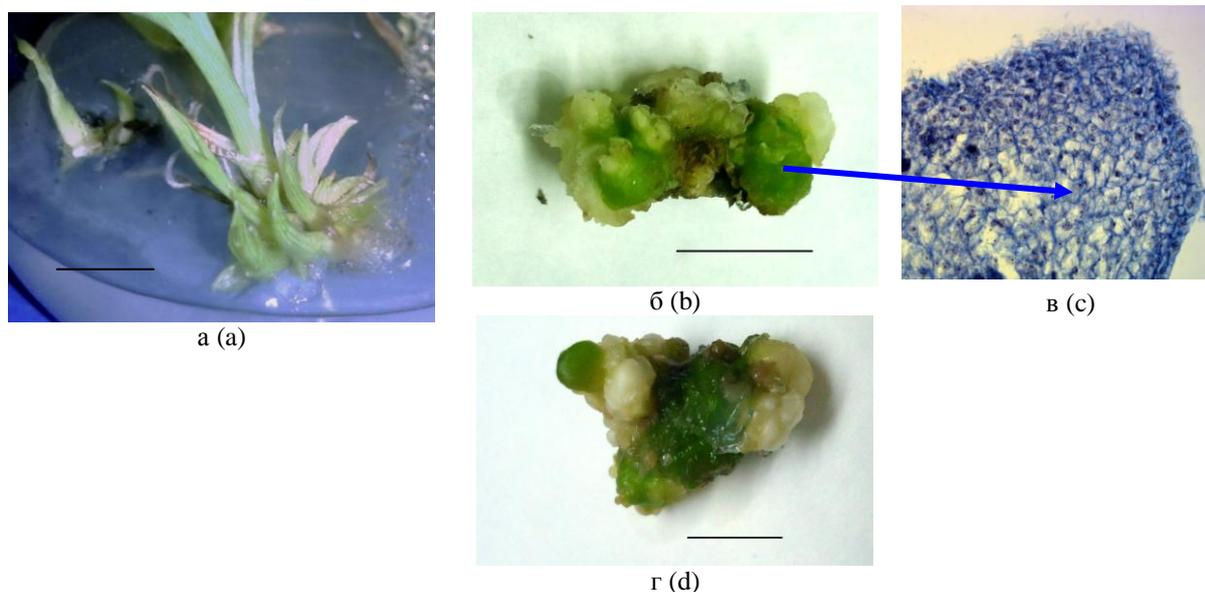


Рис. 23 Прямая регенерация микропобегов (а) и массовое формирование меристемоидов канны садовой сортов Суевия (б, в) и Ливадия (г), масштаб 1 см  
 Fig. 23 Direct regeneration of microshoots (a) and mass meristemoid formation of *Canna* cvs. Suevia (b, c) and Livadia (d), Bar 1 cm

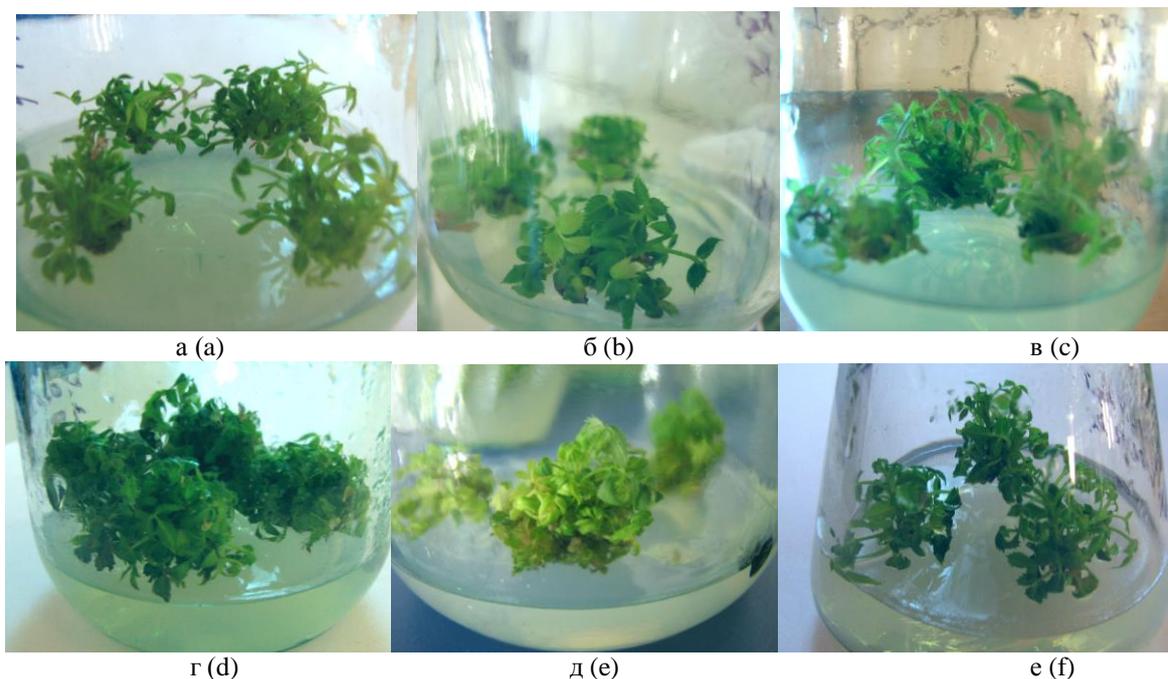
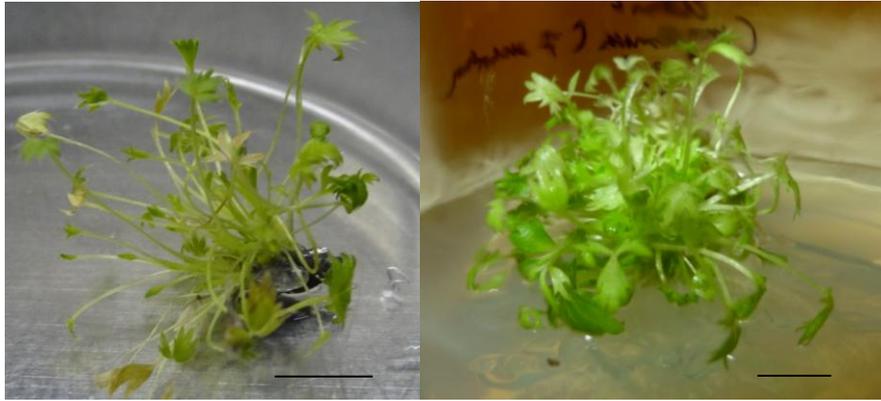


Рис. 24 Множественное побегообразование *in vitro* у разных сортов миниатюрной розы: а) Беби Бантинг, б) Мандарин, в) Рулети, г) Бигуди, д) Синдерелла, е) Цвѣркѣниг  
 Fig. 24 *In vitro* multiple microshoots regeneration of mini roses cvs. Baby Bunting (a), Mandarin (b), Ruletti (c), Bigudi (d), Cinderella (e), Zwergkoenig (f)

Для множественного побегообразования развившиеся микропобеги *P. depressa*, *P. recta*, *P. canescens* помещают на среду ½ МС с 0,2 мг/л БАП или кинетина и 0,01 мг/л НУК. Активный процесс регенерации микропобегов отмечен на вторую неделю культивирования. На 33 - 37 сутки количество микророзеток *P. recta* на эксплант

достигает в среднем  $7 \pm 2,7$  штук, при этом количество микропобегов на розетку составляет в среднем  $3,63 \pm 0,095$  шт. Вместе с тем, на 28 - 35 сутки количество микророзеток *P. depressa* на эксплант составляет в среднем 2-3 штук, а количество микропобегов на розетку в среднем достигает  $8,2 \pm 1,26$  шт. (рис. 25 а). При субкультивировании микророзеток *P. canescens* на свежеприготовленные питательные среды, дополненные кинетином, количество розеток на эксплант составляет в среднем 5-7 шт., а количество микропобегов –  $6,37 \pm 1,28$  шт./розетку (рис. 25 б).



а (a)

б (b)

**Рис. 25** Множественное побегообразование *P. depressa* (а) и *P. canescens* (б) на модифицированной питательной среде МС с БАП и НУК (масштаб 1 см)

**Fig. 25** Multiple shoot formation of *P. depressa* (a) and *P. canescens* (b) on modified culture medium MS with BAP and NAA (Bar 1 cm)

**Укоренение микропобегов *in vitro*.** Ризогенез *in vitro* размножаемых микропобегов является одним из лимитирующих факторов в биотехнологии растений. Этот процесс может быть индуцированным и спонтанным. Корни могут формироваться из разных частей (из базальной, выше базальной) микрочеренка или микропобега. Независимо от типа корнеобразования полученные регенеранты должны быть способны к последующей адаптации *in vivo*.

Активный ризогенез у всех субтропических плодовых культур можно индуцировать только после 7-8-ми пассажей. Микропобеги помещают на специализированную питательную среду  $\frac{1}{2}$  МС с разными концентрациями ауксинов. Высокие концентрации ауксинов вызывают формирование каллуса в базальной части микрочеренков и микропобегов и только после этого в единичных случаях начинается процесс ризогенеза. Такие регенеранты нежизнеспособны после перенесения в условия *in vivo*. Низкая концентрация ИМК (0,2 мг/л) стимулирует образование корней у 100% микропобегов фейхоа и киви; при этом среднее количество корней на эксплант достигает  $4,5 \pm 0,2$  штук. Укоренение микропобегов инжира происходит при добавлении в среду 1,0-2,0 мг/л НУК и зависит, прежде всего, от сорта. Полноценные растения киви, фейхоа и инжира для последующей высадки на адаптацию получают через 2, 3, 7 месяцев культивирования соответственно (рис. 26).

Для культивируемых *in vitro* микропобегов маслины европейской (донорное растение – 1000 летнее дерево, произрастающее в Никитском ботаническом саду) была характерна высокая частота укоренения. Спустя 3-4 месяца (4-5 пассажей) на агаризованной питательной среде  $\frac{1}{2}$  WPM с низким содержанием ауксинов и цитокининов (0,01 мг/л НУК и 0,25 мг/л БАП) у 80-100% микропобегов этих генотипов наблюдали непрямой ризогенез (рис. 27). Регенеранты прекрасно адаптируются к условиям *in vivo*. Лучшую адаптивную способность имели регенеранты, где длина коня не превышала 1-1,5 см.

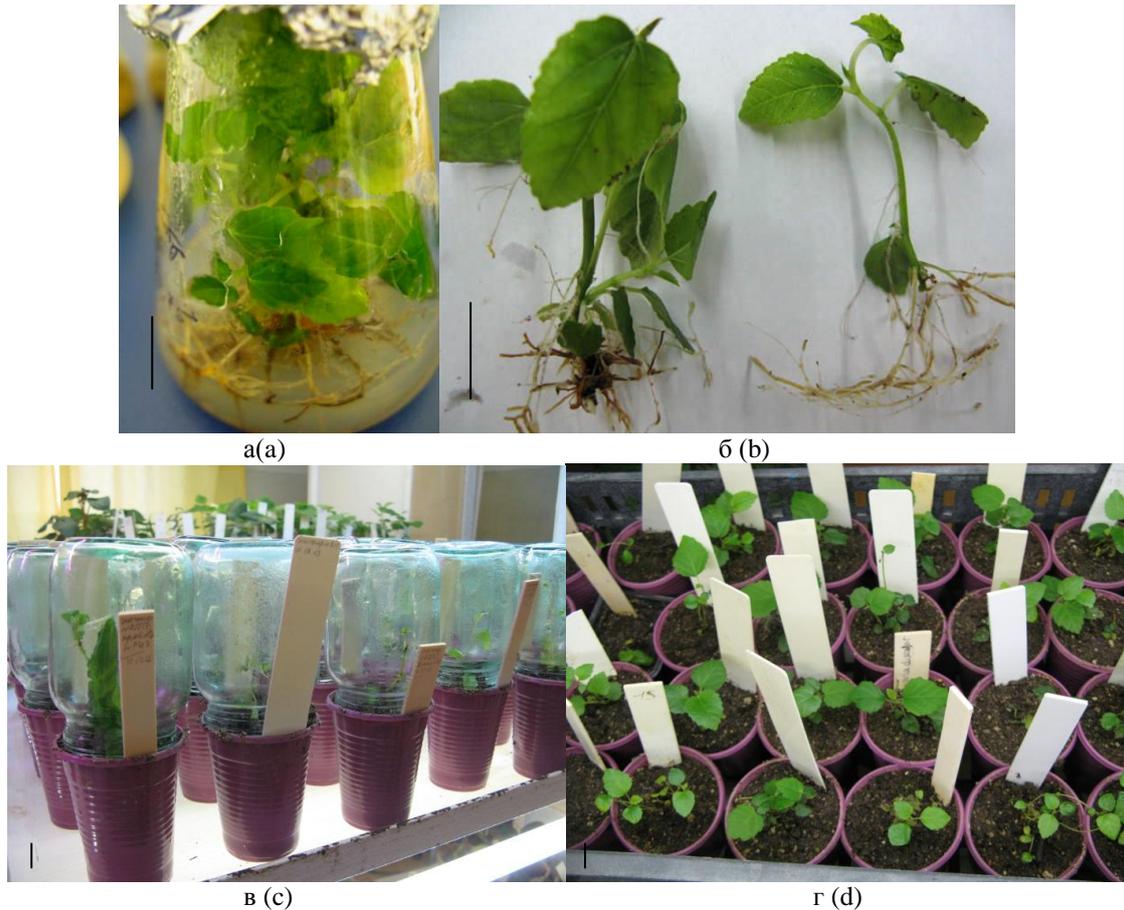


Рис. 26 Укорененные растения (а, б) и регенеранты инжира на адаптации *in vivo* (в, г). Масштаб 1 см  
 Fig. 26 Rooted plantlets (a, b) and regenerants of fig at *in vivo* adaptation (c, d). Bar 1 cm



Рис. 27. Укоренённые *in vitro* микропобеги 1000-летней маслины европейской спустя 96-120 сут с момента последнего субкультивирования на среде  $\frac{1}{2}$  WPM (масштаб 1 см)  
 Fig. 27 *In vitro* rooted microshoots of 1000 years olive after 96-120 days the last subculture on medium  $\frac{1}{2}$  WPM (Bar 1 cm)

Корнеобразование у микропобегов клематиса идет по пути спонтанного и индуцированного ризогенеза. Спонтанное образование корней отмечали на питательных средах, используемых нами для собственно микроразмножения (МС с 0,2 мг/л или 0,5 мг/л БАП) и на безгормональной среде МС с половинным набором макро- и микросолей. В этом случае сначала в основании микропобега формировался каллус, а затем развивались по 2-4 корня в среднем длиной от  $3,9 \pm 0,2$  см до  $6,5 \pm 1,1$  см у таких



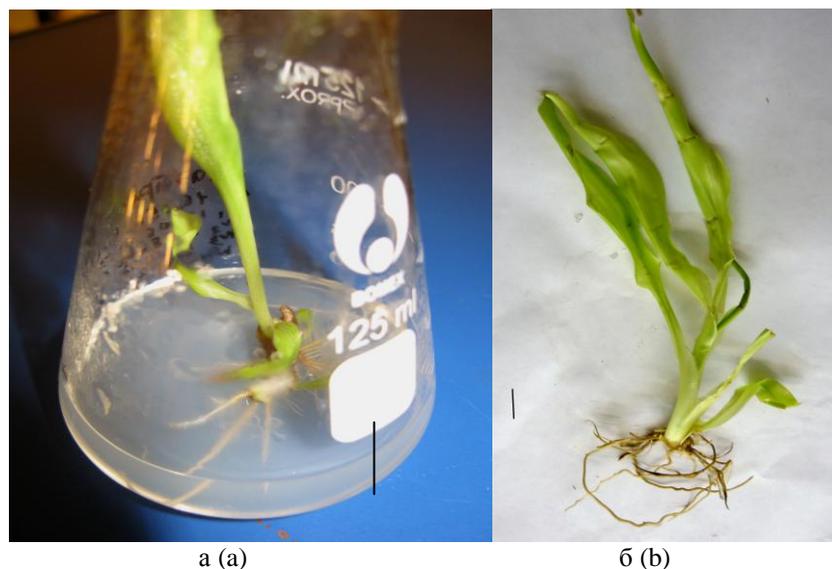


Рис. 29 Укорененные в условиях *in vitro* микропобеги сортов канны Президент (а) и Суевия (б). Масштаб 1 см

Fig. 29 Rooted *in vitro* microshoots of Canna cvs. President (a) and Suevia (b). Bar 1 cm



Рис. 30 Культивирование микропобега розы миниатюрной сорта Беби Бантинг на среде для ризогенеза (а) и укорененные *in vitro* микропобеги сорта Бигуди (б). Масштаб 1 см

Fig. 30 Microshoots of mini rose cv. Baby Banting cultivation on medium for rhizogenesis (a) and *in vitro* rooted microshoots cv. Bigudi (b). Bar 1 cm



Рис. 31 Корнеобразование *in vitro* у *P. recta* на питательной среде МС без регуляторов роста (а) и МС, дополненной 0,1 – 0,2 мг/л кинетина (б). Масштаб 1 см

Fig. 31 *In vitro* rooting of *P. recta* microshoots on  $\frac{1}{2}$  MC medium without growth regulators (a) and on  $\frac{1}{2}$  MC medium, supplemented with 0,1 – 0,2 mg l<sup>-1</sup> kinetin (b). Bar 1 cm

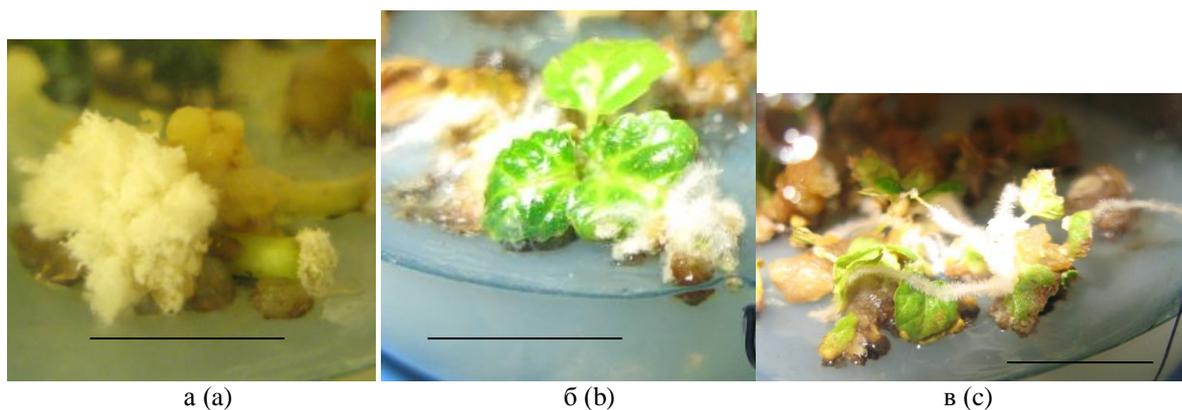
**Соматический эмбриогенез *in vitro*.** Соматический эмбриогенез *in vitro* представляет собой процесс формирования незиготических эмбриоидов непосредственно из репродуктивных и соматических тканей, путем, напоминающим зиготический эмбриогенез. Соматический эмбриогенез в настоящее время разработан для многих ценных культур, однако из года в год совершенствуются и разрабатываются новые протоколы для индукции и реализации этого процесса [12-14, 22, 24, 31].

Соматический эмбриогенез киви и фейхоа индуцируют путем формирования соматических эмбриоидов из частей зиготического зародыша, из высечек листа и сегментов микропобега. Этот процесс происходит на модифицированных питательных средах Монье и МС. Питательные среды, используемые для индукции и реализации процесса соматического эмбриогенеза, содержат в своем составе макро- и микроэлементы, витамины, регуляторы роста ауксинового и цитокининового типов действия. В процессе разработки способа соматического эмбриогенеза исследуемой культуры необходимо установить время прохождения всех стадий развития эмбриоида. Так, на протяжении 60 суток культивирования большинство эмбриоидов проходит все стадии развития зародыша: глобулы, сердечка и торпеды. Наряду с этим, эффективность соматического эмбриогенеза можно повысить за счет вторичного. Частота вторичного эмбриогенеза выше, чем первичного. Однако вторичные соматические зародыши обычно мельче в размерах, чем первичные и формируются как в темноте, так и на свету.

Нами было показано, что непрямой соматический эмбриогенез происходит на поверхности незрелых зиготических зародышей фейхоа (гибридные формы 1 и 2) только на модифицированной питательной среде МС, дополненной 1,0 – 2,0 мг/л зеатина [13]. Для индукции соматического эмбриогенеза высечки листа (ткань листа по обе стороны от центрально жилки, основание черешка) и сегменты побега с 1-2 узлам помещают горизонтально на поверхность или углубляют в питательную среду МС, дополненную различными концентрациями 2,4-Д (1,0 – 3,0 мг/л). Контролем служит среда без ауксина. В процессе изучения особенностей регенерации растений из высечки листа было установлено, что при изменении концентрации 2,4-Д от 1,0 – 3,0 мг/л 52% эксплантов реализовали свой морфогенетический потенциал через каллусогенез. Изучение зон листа фейхоа показало, что они имели невысокий регенерационный потенциал, образуя лишь единичные соматические зародыши.

У исследуемых сортов киви удалось вызвать регенерацию соматических зародышей только через непрямой соматический эмбриогенез. Чтобы достигнуть формирования 2-х типов каллуса из эксплантов киви, высечки листа и сегменты микропобегов культивируют на модифицированных питательных средах  $\frac{1}{2}$  МС, содержащих 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л БАП. Каллус образуется через 30 суток. Дифференциация эмбриогенных зон на поверхности каллуса, полученного из высечек листа и апикальной части микропобега, происходит на среде МС, дополненной 1,0 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИМК. В таком каллусе формируются соматические зародыши. Однако частота соматического эмбриогенеза очень низкая и не превышает 10%. Вместе с тем из проэмбрио развиваются полноценные регенеранты. Низкая частота соматического эмбриогенеза может быть компенсирована за счет прямой регенерации растений из высечек листа и сегментов побега полученных регенерантов. Использование ТДЗ в концентрации от 0,2 мг/л до 1,9 мг/л для прямой регенерации микропобегов дает возможность индуцировать развитие микропобегов непосредственно из листовых дисков и сегментов микропобегов киви и фейхоа. Полноценные растения киви и фейхоа, полученные через соматический эмбриогенез *in vitro*, высаживают на первичную адаптацию – на СУВР, а затем и в теплицу.

У инжира в качестве первичного экспланта для индукции прямого и непрямого соматического эмбриогенеза используют высадки листа размером 0,7x0,7 см и сегменты микропобегов длиной 1,0 см, выращенных из меристем и оздоровленных в условиях *in vitro* сортов инжира (Белый Ранний, Кадота Золотистая, Сабруция Розовая, Смена, Фиолетовый, Финиковый и Янтарный). Через 1,5-2 месяца культивирования в условиях освещения 2 – 3 клк на модифицированной питательной среде МС с 2,4-Д в концентрациях 1,5; 2,0; 3,0 мг/л получают соматические зародыши инжира сортов Сабруция Розовая и Фиолетовый на разных стадиях развития. При этом проростки длиной 1,5-3,0 см развиваются через 2-2,5 месяца (рис. 32). У всех сортов на среде МС с 2,5-3,2 мг/л ТДЗ или 0,5-3,0 мг/л 2,4-Д проростки формируются непосредственно из каллуса.

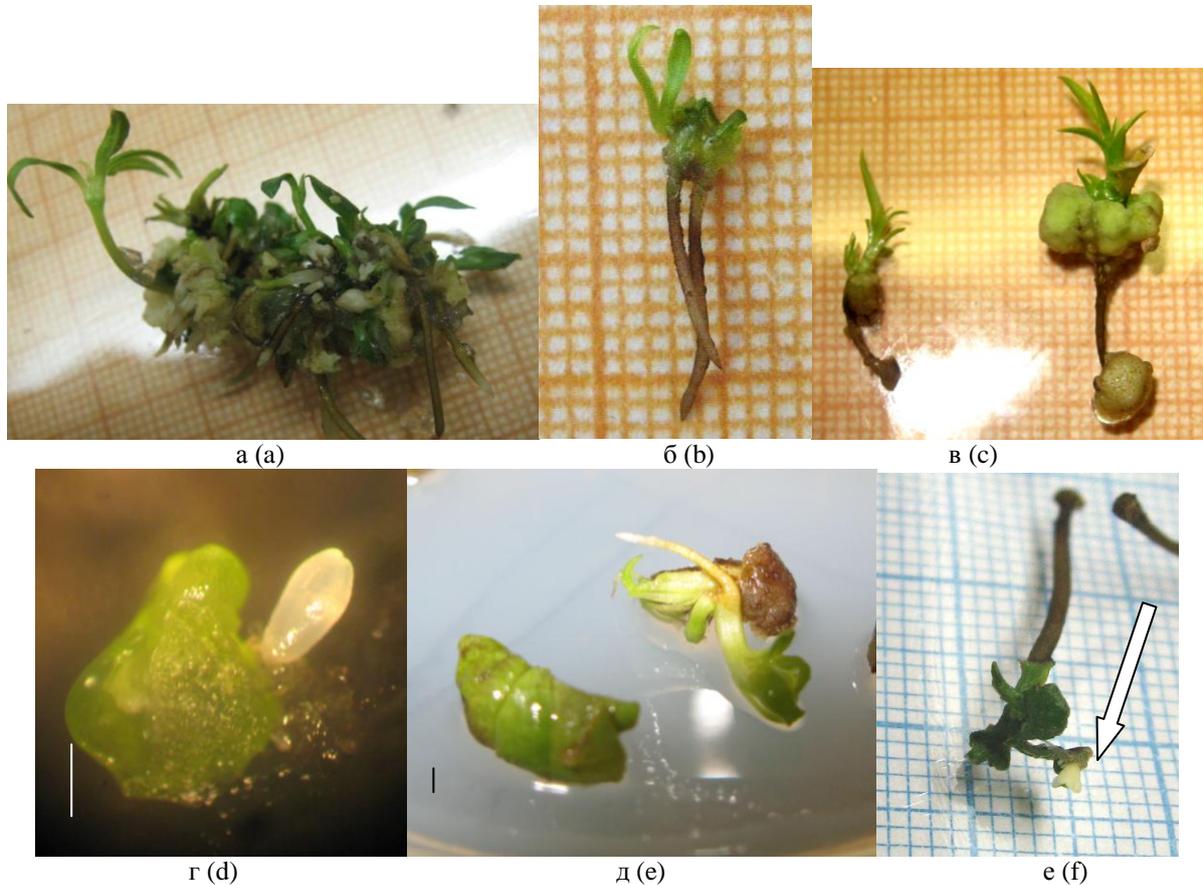


**Рис. 32** Образование эмбрионного каллуса на сегменте микропобега (а) и развитие проростков (б, в) из соматических зародышей инжира сорта Сабруция Розовая (масштаб 1 см)  
**Fig. 32** Embryogenic callus formation on part of microshoot (a) and seedlings development (b, c) from somatic embryos of fig cv. Sabrucia Rozovaya (Bar 1 cm)

Процесс непрямого соматического эмбриогенеза клематиса индуцировали на модифицированной питательной среде МС, дополненной регуляторами роста БАП (1,5; 2,0 мг/л), НУК (1,5; 1,8 мг/л), ИУК (1,5; 1,8; 2,0 мг/л), 2,4-Д (1,5; 2,0; 2,5; 3,0 мг/л) и ТДЗ (0,6, 1,3, 1,9, 2,5, 3,2 мг/л) в разных соотношениях. Исследования проводили на сортах Алёнушка, Mrs Cholmondeley, Nelly Moser, Madam le Coultre. Независимо от генотипа эксплантов в каждом из вариантов питательных сред происходило формирование каллуса от молочно-белой и бледно-желтой до ярко-зеленой и коричневой окрасок, имеющего разную консистенцию. Из верхней части каллуса развивались проростки (1-3 шт.) с 1-4 узлами и простыми листьями. Добавление в среду 1,3 мг/л ТДЗ способствовало индукции процесса соматического эмбриогенеза. Соматические зародыши на разных стадиях развития и проростки с 1-2 корнями длиной 0,8 – 1,0 см и 2-3 листьями, развившиеся из эмбриоидов, были собраны в конгломераты (рис. 33 а, б). При последующих субкультивированиях на самом проростке и на его корнях у большинства первичных эмбриоидов сорта Алёнушка формируются плотные белые глобулярные структуры, которые впоследствии темнеют (рис. 33 в). Из листовых эксплантов сорта Nelly Moser удалось индуцировать прямой соматический эмбриогенез (рис. 33 г, д). Эмбриогенез у эксплантов сортов Юность, Nelly Moser и Алёша наблюдали на питательных средах, предназначенных для размножения и удлинения микропобегов. Наряду с первичным соматическим эмбриогенезом у сорта Юность наблюдали и вторичный эмбриогенез (рис. 33 е).

Прямой соматический эмбриогенез можно индуцировать у эксплантов клематиса путем добавления в модифицированную нами питательную среду МС 0,2-2,0 мг/л БАП на фоне постоянной концентрации ИМК (0,02 мг/л). Разработка биотехнологической

системы получения растений клематиса через прямой эмбриогенез позволила нам массово размножить 8 сортов отечественной и зарубежной селекции [13]. Полученные растения закладываются на длительное хранение в генобанк *in vitro* Никитского ботанического сада.



**Рис. 33** Соматический эмбриогенез *in vitro* в культуре сегментов микропобега и высечек листа клематиса: а) конгломерат соматических зародышей и проростков сорта Аленушка; б) развившиеся проростки из соматических эмбрионидов сорта Аленушка; в) сформировавшиеся глобулярные структуры на проростках сорта Аленушка; г) прямой соматический эмбриогенез в культуре листа сорта Nelly Moser (масштаб 1 мм); д) развивающийся соматический зародыш у сорта Nelly Moser (масштаб 1 мм); е) вторичный эмбриогенез у сорта Юность

**Fig. 33** Somatic embryogenesis *in vitro* in culture of microshoots parts and leaf discs of Clematis: a) conglomerate of somatic embryoids and seedlings in cv. Alenushka; b) developed seedlings from somatic embryos cv. Alenushka (Bar 1 mm); c) formed globular structure on seedlings cv. Alenushka (Bar 1 mm); d) direct somatic embryogenesis in leaf culture of cv. Nelly Moser; e) developed somatic embryo cv. Nelly Moser; f) secondary somatic embryogenesis in cv. Yunosty

### Заключение

Таким образом, результаты, представленные в данной статье, затрагивают многолетние исследования, проведенные сотрудниками лаборатории биотехнологии и вирусологии Никитского ботанического сада – Национального научного центра, в области изучения процессов органогенеза и соматического эмбриогенеза *in vitro*, выявления закономерностей развития эксплантов целого ряда представителей семейств Ranunculaceae, Cannaceae, Moraceae, Rosaceae, Myrtaceae, Oleaceae, Actinidiaceae и их регенерации. Раскрыты основные принципы организации биотехнологических исследований. Отражены все методические аспекты прохождения каждого этапа культивирования изучаемых объектов.

Как конечный результат необходимо представить биотехнологическую схему размножения и получения растений представителей семейств Ranunculaceae, Cannaceae, Moraceae, Rosaceae, Myrtaceae, Oleaceae, Actinidiaceae через органогенез и соматический эмбриогенез (рис. 34), которая полностью раскрывает морфогенетический потенциал исследуемых нами видов и сортов.

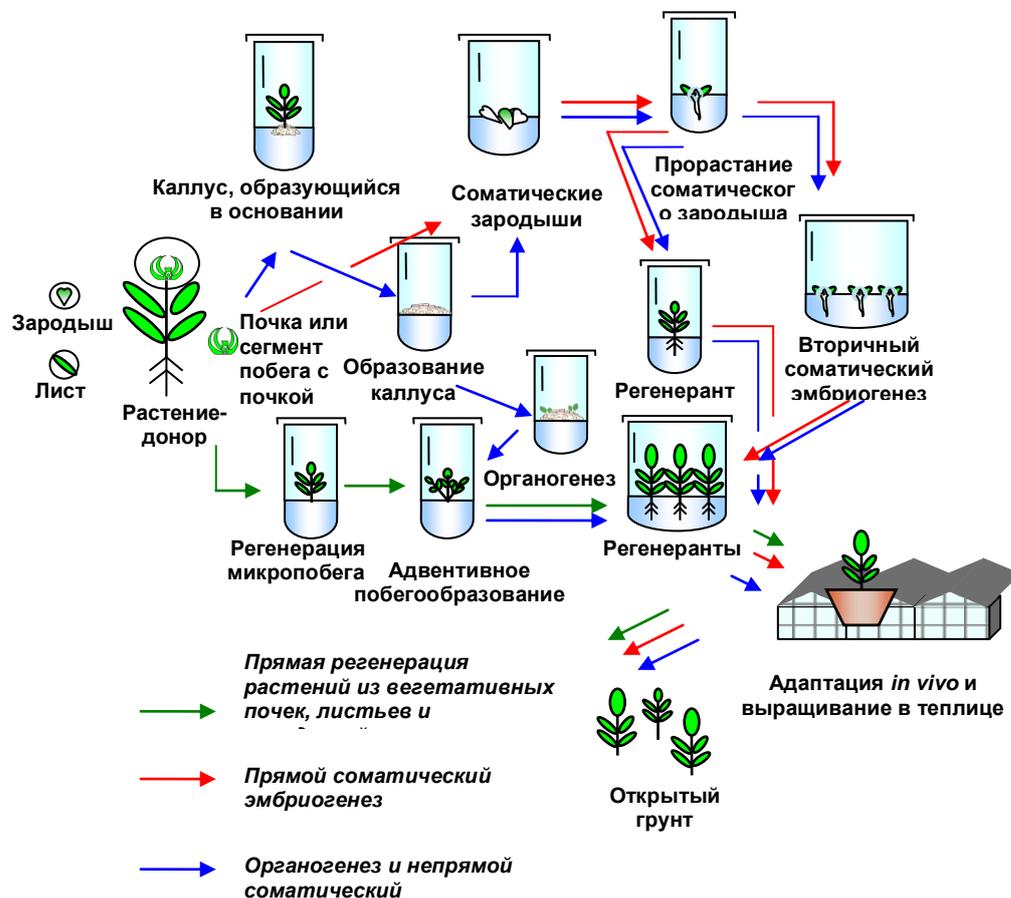


Рис. 34 Биотехнологическая схема размножения и получения растений представителей семейств Ranunculaceae, Cannaceae, Moraceae, Rosaceae, Myrtaceae, Oleaceae, Actinidiaceae через органогенез и соматический эмбриогенез *in vitro*

Fig. 34 Biotechnological scheme of propagation and obtaining of plants in families Ranunculaceae, Cannaceae, Moraceae, Rosaceae, Myrtaceae, Oleaceae, Actinidiaceae via organogenesis and somatic embryogenesis *in vitro*

Представленную биотехнологическую схему можно как основу использовать для разработки способов размножения ценных генотипов декоративных, плодовых и пряноароматических культур.

#### Список литературы

1. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений: учебник. – С.Пб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2002. – 232 с.
2. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
3. Бутенко, Р.Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений: 35-е Тимиряз. чтен. – М.: Наука, 1975. – 50 с.
4. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. пособ. – М.: ФГК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.

5. *Иванова Н.М.* Особенности морфогенезу та клональне мікророзмноження деяких квітково-декоративних культур: Автореф. Дис. ... кандидата біол. наук /Нікітський ботанічний сад –Національний науковий центр УААН. – Ялта, 2009. – 20 с.
6. *Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В.* Технология микрклонального размножения растений. – К.: Наук. думка, 1992. – 232 с.
7. *Кондратенко О.В., Митрофанова И.В.* Особенности клонального микро-размножения двух сортов миниатюрных роз // Бюл. Никит. ботан. сада. – 2002.- Вып. 86. – С. 38-40.
8. *Кондратенко О.Н., Митрофанова И.В.* Влияние различных концентраций витаминов на рост и развитие растений фейхоа (*Feijoa sellowiana* Berg.) в культуре *in vitro* // Учен. зап. Таврического Нац. Ун-та. – Сер. Биология. – 2003. – Т. 16 (55), № 2. – С. 98-102.
9. *Корзина Н.В.* Микро размножение перспективных сортов черешни (*Prunus avium* L.) в условиях *in vitro* // Сб. науч. трудов Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 112-117.
10. *Кунах В.А.* Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
11. *Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А.* Біотехнологія рослин: Підручник. – К.: Полиграф Консалдинг, 2003. – 250 с.
12. *Митрофанова И.В.* Микрклональное размножение субтропических и тропических плодовых культур (обзор литературы) // Сб. науч. трудов Никит. ботан. сада. – 1997. – Т. 119. – С. 63-95.
13. *Митрофанова И.В.* Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. – К: Аграрна наука, 2011. – 344 с.
14. *Митрофанова І.В., Митрофанова О.В., Иванова Н.М., Лесникова-Седошенко Н.П.* Методичні рекомендації з культури недозрілих зародків, культури зав'язі і сім'ябруньок та соматичного ембріогенезу ківі, зизифуса, хурми, фейхоа. – Ялта: НБС-ННЦ, 2010. – 28 с.
15. *Митрофанова О.В.* Вирусные болезни промышленных цветочных культур и биотехнологические приемы оздоровления. – М., 1992. – Деп. в ВИНТИ, № 1729-В92 от 25.05.92. – 206 с.
16. *Митрофанова О.В., Логвиненко И.Е., Иванова Н.Н.* Регенерация растений из изолированных органов и тканей *Artemisia balchanorum* Krasch. и *Artemisia scoparia* W.K. // Сб. науч. трудов Никит. ботан. сада. – 1997. – Т. 119. – С. 143-153.
17. *Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Работягов В.Д., Иванова Н.Н.* Клеточная селекция новых лекарственных растений *in vitro* // Переработка лекарственного сырья и производство фитопрепаратов для медицины и сельского хозяйства: Тез. докл. междунар. науч.-практ. конф., (5-6 сентября 1996, Алматы, Казахстан). – Алматы, 1996. – С. 74.
18. *Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Смыков А.В., Лесникова Н.П.* Методы биотехнологии в селекции и размножении субтропических и косточковых плодовых культур // Сб. науч. трудов Никит. ботан. сада. – 1999. – Т. 118. – С. 189-199.
19. *Brown D.C.W., Thorpe T.A.* Plant regeneration by organogenesis // Cell culture and somatic cell genetics of plants. III. / Ed. I.K. Vasil. – Oriando: Florida: Acad. Press Inc., 1986. – P. 49-65.
20. *Christianson M.I., Warnik D.A.* Organogenesis *in vitro* as a developmental process // HortSci. – 1988. – Vol. 23, N 3. – P. 515-519.
21. *Guo B., Bilal Haider Abbasi, Amir Zeb, Xu L.L., Wei Y.H.* Thidiazuron: A multi-dimensional plant growth regulator // African J. of Biotechnology. – 2011. – Vol. 10 (45). – P. 8984-9000.

22. Jain S.M., Ishii K. Micropropagation of Woody Trees and Fruits. – Netherlands: Dordrecht: Kluwer Acad. Publishers, 2003. – 852 p.
23. Lloyd G., McCown B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture // Proc. Int. Plant Prop. Soc. – 1980. – Vol. 30. – P. 420-427.
24. Merkle S.A. Somatic embryogenesis in ornamentals // Biotechnology of Ornamental Plants / Eds. R.L. Geneve, J.E. Preece, S.A. Merkle. – Wallingford: CAB Intl, 1997. – P. 13-33.
25. Monnier M. Croissance et developpement des embryons globulaires de *Capsella Bursa-pastoris* cultivés *in vitro* dans un milieu a la base d'une nouvelle solution minerale // Bull. Soc. Bot. France, Memoires, Coll. Morphologie. – 1973. – P. 179-194.
26. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with *Tobacco* tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V.15, N 3. – P. 473-497.
27. Neumann K.-H., Kumar A., Imani J. Plant Cell and Tissue Culture – A Tool in Biotechnology, Principle and Practice. – Berlin: Heidelberg: Springer-Verlag, 2009. – 342 p.
28. Pierik R.L.M. *Anturium andreanum* plantlets produced from callus tissue cultivated *in vitro* // Physiol. Plant. – 1976. – V. 37, N 1. – P. 80-82.
29. Quoirin M., Lepoivre P. Etudes de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus* // Acta Hort. – 1977. – N 78. – P. 437-442.
30. Reinert J. Morphogenese und ihre Kontrolle and Gewenbekulturen aus Carotten // Naturwissenschaften. – 1958. – Bd. 45. – S. 344–345.
31. Somatic Embryogenesis of Trees: Proceedings of the IUFRO Working Party 2.09.02 of Conf. “Advances in Somatic Embryogenesis of Trees and Its Application for the Future Forests and Plantations” / Eds. Y.S. Park, J.M. Bonga, S.Y. Park, H.K. Moon. – Suwon: Republic of Korea, 2010. – 143 p.
32. Steward F.C. Growth and development of cultivated cells. III. Interpretations of the growth from free cell to carrot plant // Amer. J. Bot. – 1958. – Vol. 45. – P. 709-713.
33. Steward F.C., Mapes M.O., Smith J. Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells // Amer. J. Bot. – 1958. – Vol. 45. – P. 693-703.
34. Thomas E., Konar R.N., Street H.E. The fine structure of the embryogenic callus of *Ranunculus sceleratus* L. // J. Cell Sci. – 1972. – Vol. 11. – P. 95-109.
35. Thorpe T.A., Harry I.S. Application of tissue culture to horticulture // Acta Hort. – 1997. – N 447. – P. 39-49.

*Часть исследований, представленных в статье выполнено при поддержке Российского научного фонда в рамках гранта «Сохранение и изучение растительного генофонда Никитского ботанического сада и разработка способов получения высокопродуктивных сортов и форм садовых культур юга России методами классической и молекулярной селекции, биотехнологии и биоинженерии» (2014-2018 гг.)*

**Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Korzina N.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Ivanova N.N., Tefvik A.Sh., Pilipchuk T.I., Zaiats A.Yu., Chelombit S.V., Melihova G.I. Methodological aspects in the study of organogenesis and somatic embryogenesis *in vitro* of representatives in families Ranunculaceae, Cannaceae, Moraceae, Rosaceae, Myrtaceae, Oleaceae, Actinidiaceae // Works of the State Nikit. Botan. Gard. – 2014. – V. 138. – P. 102-136.**

The work displayed methodological approaches in the organization of laboratory studies of *in vitro* morphogenesis in higher plants: the selection of information about plant objects, equipment features of the laboratories (equipment and supplies), the requirements for the preparation of sterile glassware, tools, and distilled water for aseptic work. On the basis of the results identified the main steps of regeneration of plants, representatives of families Ranunculaceae, Cannaceae, Moraceae, Rosaceae, Myrtaceae, Oleaceae, Actinidiaceae through organogenesis and somatic embryogenesis *in vitro*

**Key words:** *methodological approaches, organogenesis, somatic embryogenesis, in vitro.*

УДК 634.1.055:578.864

## МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ВЫЯВЛЕНИЮ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСА ШАРКИ СЛИВЫ (*PLUM POX VIRUS*) НА РАЗНЫХ ВИДАХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *PRUNUS*

И.В. МИТРОФАНОВА<sup>1</sup>, О.В. МИТРОФАНОВА<sup>1</sup>, С.Н. ЧИРКОВ<sup>2</sup>,  
Н.П. ЛЕСНИКОВА-СЕДОШЕНКО<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Никитский ботанический сад – Национальный научный центр, г. Ялта

<sup>2</sup> Московский государственный университет им М.В. Ломаносова, г. Москва

Представлены методические подходы и результаты многолетних исследований, касающихся мониторинга распространения вируса шарки сливы (*Plum pox virus*) на юге Украины и в Крыму. В работе имеется информация о самом вредном организме и симптомах болезни, вызываемой вирусом шарки сливы. Отражена характеристика *Plum pox virus* и особенности выявления фитопатогена. Продемонстрированы основные методы идентификации вируса шарки сливы: биологический метод, методы ИФА, ИХА и ПЦР-анализа.

**Ключевые слова:** вирус шарки сливы, мониторинг, симптомы, методы идентификации.

### Введение

Несмотря на то, что в большинстве стран вирус шарки сливы (*Plum pox potyvirus* или PPV) считается карантинным объектом, он очень распространён в насаждениях косточковых плодовых культур практически во всём мире. Обычно считают, что эпидемия PPV началась вначале прошлого века на Балканах. Впервые шарка была зафиксирована на сливе европейской (*Prunus domestica* L.) в Болгарии в 1917-1918 гг. и описана как вирусная болезнь в 1932 г. С тех пор вирус распространился по большей части территории Европы, на Средний Восток (Турция, Иран, Сирия), в Африку (Египет, Тунис), Азию (Индия, Китай, Казахстан, Пакистан) в конце XX века проник в Новый Свет (Чили, Аргентина, США, Канада). В 2009 году PPV был впервые выявлен в Японии [35].

Ежегодный экономический ущерб во всём мире оценивается в 10000 миллионов евро, а количество выкорчеванных и уничтоженных в последние годы зараженных деревьев исчисляется миллионами [17].

PPV – вид рода *Potyvirus* семейства *Potyviridae*. Вирусные частички представляют собой изогнутые палочки размером 700 нм x 11 нм, состоящие из однониточной молекулы РНК примерно с 10000 нуклеотидов, покрытой 2000 субъединицами единственного белка оболочки. Главным источником распространения вируса шарки сливы являются зараженные деревья рода *Prunus*. Вирус передаётся и распространяется с посадочным материалом, а также насекомыми-переносчиками. Основным путём распространения вируса PPV в промышленных садах является осенний перенос его крылатыми тлями, откладывающими зимние яйца на плодовых деревьях. После инокуляции инкубационный период может длиться несколько месяцев, а системное распространение продолжается даже несколько лет. Доказан перенос вируса шарки пыльцой и семенами.

Изоляты PPV можно классифицировать на семь типов, или штаммов: *D* (Dideron), *M* (Marcus), *C* (Cherry), *EA* (El Amar), *W* (Winona), *Rec* (Recombinant) и *T* (Turkish) [19, 29, 44]. Штаммы различаются по патогенности; так, изоляты штамма *M* вызывают более быстрое развитие болезни и более серьёзные её симптомы, чем изоляты штамма *D* на абрикосе (*P. armeniaca* L.), сливе (*P. domestica*), персике (*P. persica* (L.) Batsch) и сливе китайской (*P. salicina* Lindl.). Изоляты *EA* географически

ограничены территорией Египта, и об их эпидемиологии и биологических свойствах имеется очень мало информации. В некоторых европейских странах недавно были идентифицированы изоляты PPV, заражающие черешню (*P. avium* (L.) L.) и вишню (*P. cerasus* L.). Данные изоляты формируют отдельный тип, названный PPV-C. В Канаде из растения сливы европейской (*P. domestica*) был выделен атипичный изолят PPV-W, представляющий собой отличный от остальных штамм. Кроме того, естественные рекомбинанты между штаммами *D* и *M* были описаны как штамм PPV-Rec, проявляющий эпидемиологические свойства, подобные штамму *D*. Недавно в Турции сообщалось о выявлении рекомбинантного изолята другого типа (типа *T*).

PPV присуща чёткая молекулярная вариабельность некоторых участков генома, прежде всего гена белковой оболочки (БО) и генов РЗ-6К1. Самой вариабельной частью молекулы БО является иммунодоминантный N-конец длиной 93 аминокислоты, в котором сосредоточено большинство штаммспецифичных эпитопов. Антигенные отличия N-конца молекулы БО стали основанием для группировки большинства известных изолятов вирусу в 7 типов, или штаммов.

В исследованиях предыдущих лет также показано присутствие PPV в насаждениях косточковых плодовых культур в различных регионах Украины и выявлена тенденция его распространения в т.ч. на Южном берегу Крыма [8, 9, 14, 31]. В настоящее время идентифицированы несколько изолятов, выявленных в различных агроклиматических зонах Крыма, и показана их принадлежность к штаммам *D* [1, 3, 5] и *Rec*.

Целью наших исследований было не только выявление в насаждениях косточковых плодовых культур вируса шарки сливы, его лабораторная идентификация, но и разработка методических подходов к проведению мониторинга распространения карантинных фитопатогенов в Республике Крым.

### Объекты и методы исследований

Основным объектом исследования был вирус шарки сливы (*Plum pox potyvirus*), распространённый в насаждениях косточковых плодовых культур (персика, нектарина, абрикоса, сливы и алычи) на юге Украины и в Крыму. Для идентификации вируса в отобранных нами образцах косточковых плодовых культур использовали биологический тест, иммунохимические методы анализа (ИХА), методы иммуноферментного анализа (ИФА) и анализа полимеразной цепной реакции (ПЦР-анализ).

### Результаты и обсуждения

#### Информация о вредном организме

**Таксономическая информация.** Научное название: *Plum pox virus* (PPV). Синоним: Вирус шарки сливы. Таксономическая позиция: род *Potyvirus*, семейство *Potyviriidae*. Общие названия: шарка, оспа сливы

**Распространённость и хозяева PPV.** В настоящее время болезнь шарки сливы имеет следующий статус распространённости в различных странах мира: широкое (высокий уровень) – в Хорватии, Германии, Греции, Болгарии, Венгрии, Польше, Румынии, России, Сербии, Словакии; ограниченное распространение (гетерогенный уровень) – в Албании, Аргентине, Австрии, Канаде, на Кипре, в Чехии, Египте, Франции, Италии, Иране, Казахстане, Люксембурге, Молдове, Норвегии, Пакистане, Португалии, Южной части России, Словении, Испании, Сирии, Турции, Великобритании, США и на Украине; ввезен и создан – на Азорских островах, в Боснии и Герцеговине, Чили, некоторых государствах бывшего СССР, в том числе странах Центральной Азии, Индии, Иордании, Латвии, Нидерландах, Швейцарии, Тунисе; ввезен и присутствует – в Бельгии, Дании; отсутствует – в Эстонии, Финляндии, Ирландии, Израиле, Ливане, на Мальте, в Марокко, Палестине, Швеции; неизвестен – в Ливии [42].

На Украине (в Черновицкой области) вирус шарки сливы впервые был зарегистрирован в 1966 г. [11]. В настоящее время очаги заражения шаркой сливы зарегистрированы в 8 регионах Украины (Винницкая, Закарпатская, Ивано-Франковская, Львовская, Николаевская, Одесская, Тернопольская, Черновицкая области) и Республике Крым [6, 7, 10, 12, 31, 36].

Возбудитель поражает почти все косточковые, в т.ч. сливу (*Prunus domestica*), персик (*P. persica*), нектарин (*Prunus persica* (L.) Batsch var. *nectarina* (Aiton) Maxim.), абрикос (*P. armeniaca*), алычу (*P. cerasifera*), миндаль (*P. dulcis* (Mill.) D.A.Webb), черешню (*P. avium*) и вишню (*P. cerasus*), вишню антипку (*P. mahaleb* L.). Терн (*P. spinosa* L.) и тернослива (слива Дамсона, *Prunus domestica* subsp. *insititia* (L.) C.K.Schneid.) являются латентными носителями вируса шарки, при этом на них также отмечены симптомы проявления пораженности вирусом PPV. Такие виды декоративных культур и подвоев также являются хозяевами: *Prunus blireana*, *P. brigantina* Vill., *P. cistena*, *P. glandulosa* Thunb., *Prunus armeniaca* L. var. *holosericea* Batalin, *P. mume* Siebold & Zucc., *P. hortulana* L.H.Bailey, *P. japonica* Thunb., *P. kurdina*, *P. maritima* Marshall, *P. mandschurica* (Maxim.) Koehne, *P. nigra* Aiton, *P. pumila* L., *P. sibirica* L., *P. triloba* Lindl., *P. simonii* Carrière, *P. salicina* Lindl.

Кроме их, резерваторами вируса могут быть следующие сорняки: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., *Chenopodium foetidum* Schrad., *Nicotiana benthamiana* Domin, *N. clevelandii* A.Gray, *N. glutinosa* L., *Campanula rapunculoides* L., *Lycium hamilifolium* Mill., *Urtica dioica* L., *Lamium purpureum* L., *Medicago falcata* L., *Ranunculus sardous* Crantz, *Trifolium repens* L., *Solanum dulcamara* L., *Vicia faba* L., *Pisum majaricum*, *P. sativum* L., *P. pilosus*, *Clematis* sp. L. и другие [2, 42].

**Способы переноса инфекции.** Вирус шарки сливы переносится через посадочный и подвойный материал, механическим путём, пылью и тлями. Тли переносят вирус непersistентно. Он сохраняет инфекционность в организме тлей не более 4 часов и переносится на стилете насекомого [2, 6, 12].

Место инфицирования – преимущественно эпидермис. Процент переноса зависит от штамма вируса и вида растения-хозяина. Самыми активными переносчиками являются персиковая тля – *Myzus persicae*, чертополоховая – *Aphis cardui*, хмелевая – *Phorodon humuli*, люцерновая – *Aphis craccivora*, в теплице – таволговая – *A. spiraeicola*, тля Давидсона – *Myzus varians* Davidson (рис. 1) [2, 32, 34, 42]. Передача персиковой тлём составляет от 41 до 85%.

Возможен перенос с семенами абрикоса, сливы, персика, нектарина, алычи, который может достигать 14%. Однако в природе он наблюдается редко.

#### **Симптомы болезни**

Вирус шарки сливы поражает всю крону дерева. Симптомы шарки сливы в значительной степени зависят от мест произрастания, времени года, вида и сорта *Prunus*, а также от органа растения (плоды или листья). При естественном заражении симптомы появляются через 9-11 месяцев после заражения.

В результате проведенных исследований определены оптимальные сроки проявления внешних признаков болезни отбора сортообразцов – апрель-июнь, август-сентябрь (в периоды формирования розового бутона, распускания цветка, формирования листьев и созревания плодов). Выявлены и описаны самые характерные внешние признаки проявления вируса шарки сливы на различных сортах исследуемых культур, что обеспечит своевременное выявление очагов болезни (рис. 2 – 6).

Развитие и интенсивность симптомов сильно зависят от растения-хозяина и климатических условий; так, вирус может оставаться латентным в течение нескольких лет в холодном климате.

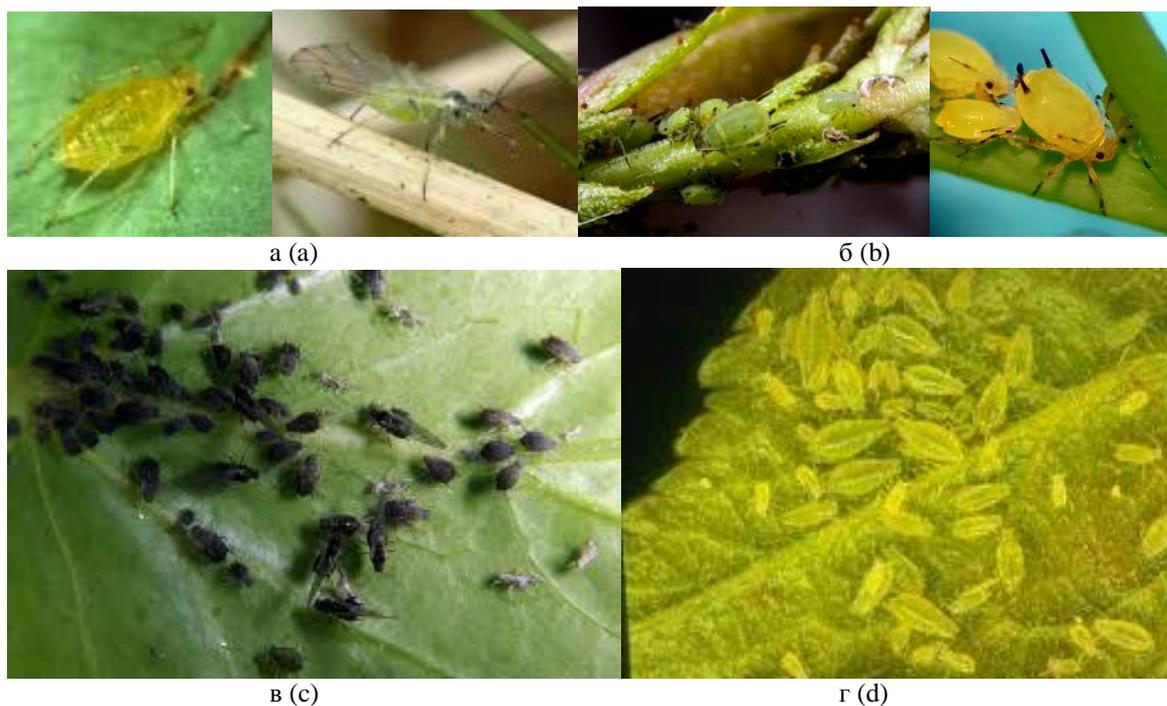


Рис. 1. Переносчики вируса шарки сливы: а) *Myzus persicae*; б) *Aphis spiraeicola*; в) *A. craccivora*; г) *Phorodon humuli*

Fig. 1 Insect vectors of *Plum pox virus*: а) *Myzus persicae*; б) *Aphis spiraeicola*; в) *A. craccivora*; д) *Phorodon humuli*



Рис. 2. Характерные симптомы проявления поражённости PPV на цветках нектарина  
Fig. 2 Typical symptoms of PPV on infected flowers of nectarine



Рис. 3. Цветки персика, поражённые PPV  
Fig. 3 Peach flowers infected by PPV



а (а)  
б (б)

Рис. 4. Симптомы проявления поражённости PPV лепестков и цветков алычи (а) и сливы (б)  
Fig. 4 Syntoms PPV on infected petals and flowers of Cherry plum (a) and plum (b)

Что касается соцветий, то симптомы могут проявиться на лепестках и цветках (обесцвечивание) некоторых сортов персика, абрикоса, сливы, нектарина в результате заражения PPV-D. Проявления болезни имеют четкие симптомы в виде полос и пятен.

Весной на молодых листьях сливы и алычи можно найти расплывчатые светло-зеленые пятна в виде широких полос и колец. На больших листьях окраска пятен бывает желтовато-зелёной, достаточно яркой.



**Рис. 5. Различные симптомы проявления PPV на листьях персика и нектарина в Крыму**  
**Fig. 5 Various symptoms of PPV on leaves of peach and nectarine in Crimea**

На листьях абрикоса весной появляются хлоротические бледно-зеленые линии, кольца, пятна, которые держатся до середины лета. Плоды имеют хлоротические, желтые кольца и часто деформируются, мякоть пропитана камедью. На косточках тоже могут быть видны чёткие коричневые пятна, окружённые светлым ореолом. Плоды сливы восприимчивых сортов проявляют сильную деформацию, вдавленные фиолетовые кольца или дуги, бледно-красную окраску мякоти и коричневые пятна на косточках, внутренний гомоз и некроз тканей. У них уменьшается содержание сахара и кислоты, и они становятся полностью невкусными.

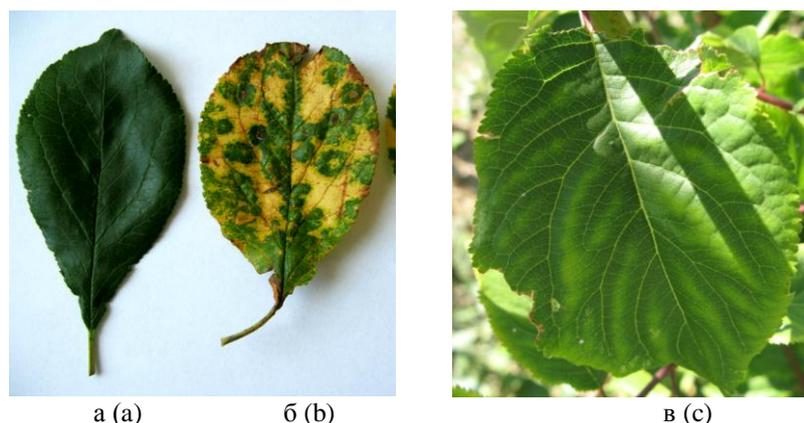


Рис. 6. Симптомы проявления PPV на листьях сливы (а – лист здорового растения; б, в – поражённого)

Fig. 6 Symptoms of PPV on leaves of plum (a – leaf of healthy plant; b, c – infected leaf)

У персика на листьях наблюдается хлороз вторичных-четвертичных жилок, но обычно данный симптом тяжело наблюдать в садах. Симптомы на плодах видны чётко через 4-6 недель до созревания. Они представляют собой белые, красные или зеленоватые кольца (пятна) на белоплодных, красно- и желтоплодных сортах соответственно. На очень восприимчивых сортах может наблюдаться слабая деформация. Подобные симптомы отмечены на нектарине (рис. 7). Плоды могут иметь неправильную форму, и на них под обесцвеченными кольцами могут развиваться бурые или некротические участки. Зараженные плоды могут иметь коричневую или гнилую мякоть и плохое качество. При сильной степени заражения инфицированные плоды преждевременно опадают. Как правило, на плодах ранних сортов развиваются более чёткие симптомы, чем на поздних сортах.

Симптомы на листьях алычи и мирабели имеют вид пятен, колец и полос различной формы. На плодах в основном некрозы и деформация отсутствуют, но могут и выявиться в виде отдельных вдавленных пятен и колец.

На косточках зараженных растений абрикоса (*P. armeniaca*) развиваются типичные светлые кольца или пятна. Алкогольные и спиртовые напитки из зараженных плодов непригодны для продажи из-за нежелательного запаха.

Практически устойчивые сорта не проявляют свойственного некротического узора на плодах. Симптомы у них развиваются в виде мозаичного узора на кожеце плодов, отдельных красноватых колец, дуг или пёстрой мозаичной окраски без некротических вдавленностей и заметной деформации.

К числу восприимчивых сортов относятся сорта сливы типа Венгерок, такие как Венгерка Обыкновенная, Венгерка Опошнянская, Венгерка Итальянская, Венгерка Циммера, Венгерка Молдавская, а также Монарх, Пожегача, Кюстендильская, Королева Виктория, Гигант Прюн, Пурпур Першор, Северен Кросс, Майорис Сидлинг и др.

В группу практически устойчивых сортов включены Анну Шпет, Ренклюд Зеленый, Ренклюд Фиолетовый, Венгерку Ажанскую, Раннюю Бюльскую, Стенли, Венгерку Раннюю, Ренклюд Альтана, Рекорд, Викторию, Великую Синюю, Ренклюд Волга, Венгерку ВИРа, Венгерку Бессарабскую и др.

Не поражаются сорта сливы Ундервуд, Опал, Якуб, Желтая Бутылковидная, Сколдус и т. д. Однако в последние годы наблюдается явление активного распространения PPV на практически устойчивых сортах и такой сорт как Стенли, по степени поражения необходимо переместить в группу особо восприимчивых сортов.



Рис. 7. Симптомы вируса шарки сливы на плодах персика и нектарина  
 Fig. 7 Sharka Symptoms on the fruits of peach and nectarine

#### **Характеристика и выявление вируса шарки сливы**

Возбудитель шарки относится к группе ПОТИ-вирусов и представляет собой нитеобразные частицы длиной 750-760 нм и шириной 15-20 нм, содержащие одну молекулу РНК, весом  $3,5 \times 10^6$  дальтон. Различные молекулы РНК, выделенные из PPV, были клонированы. В клетках пораженных растений возбудитель образует характерные вирусные вкрапления типа розеток, видимые в электронный микроскоп. Функционирование генома в PPV в настоящее время досконально изучено, и вирус шарки сливы является модельным для исследования молекулярной биологии ПОТИ-вирусов. Вирус имеет несколько штаммов. Один из них — хлоротический, переносится тлями, — даёт мягкие симптомы и низкую концентрацию вируса на листьях *Nicotiana clevelandii*, другой — некротический, не переносится тлями, даёт высокое содержание у *Nicotiana clevelandii* и ярко выраженные симптомы.

Общее руководство по методике отбора образцов согласно Международным стандартам фитосанитарной оценки приведено в *ISPM 27 DIAGNOSTIC PROTOCOLS DP 2: Plum pox virus* (2012). Для выявления PPV очень важен правильный отбор

образцов. Во время отбора необходимо учитывать биологию вируса и местные климатические условия, в частности погодные условия в период выращивания. Если присутствуют типичные симптомы, необходимо отбирать соцветия, листья и плоды с симптомами. На бессимптомных растениях, как минимум, образцы следует отбирать с однолетних побегов на середине каждой из основных ветвей, имеющих зрелые или полностью распутившиеся листья (выявление не надёжно на побегах одного года). Образцы следует отбирать, как минимум, из четырёх различных участков (например, четыре ветви или четыре листа) каждого растения; это критически важно в связи с неравномерным распределением PPV. Отбор образцов не должен проводиться в месяце с наиболее высокими температурами. Результаты анализов образцов, собранных осенью, менее достоверны, чем анализы образцов, отобранных ранней весной. Растительный материал желательно собирать с внутренних частей коры дерева. В весенний сезон в качестве образцов могут быть использованы цветки, молодые побеги с полностью распутившимися листьями или плоды. Летом и осенью для проведения анализа могут быть использованы зрелые листья и кожица спелых плодов, отбираемых в саду или на упаковочном предприятии. Цветки, листья, побеги и кожицу плодов можно хранить при температуре 4°C в течение не более 10 дней перед тестированием. Плоды могут храниться при температуре 4°C в течение месяца перед тестированием. Зимой можно отбирать спящие почки или кусочки коры с базальной части побегов, веточек или веток, или целые участки отростков.

Выявление PPV может проводиться с использованием биологических, серологических или молекулярных тестов, идентификация требует серологического или молекулярного тестирования. Серологическое или молекулярное тестирование – это минимальные требования для выявления и идентификации PPV (например, во время стандартной диагностики вредного организма в странах с его широким распространением). Однако, если Национальной организации по карантину и защите растений (НОКЗР) будет необходимо дополнительное подтверждение достоверности PPV (например, выявление в зоне, где вирус не встречается, или выявление в грузе, происходящем из страны, где вредный организм считается отсутствующим), может быть проведено дополнительное тестирование. Если первоначальная идентификация проводилась молекулярным методом, дальнейшие проверки следует проводить с применением серологических методов и наоборот. В следующих тестах может быть проведена идентификация штамма выявленного изолята PPV. В любом случае в тесты должны быть включены положительные и отрицательные контроли. Рекомендуемые методики описаны в данной статье далее.

В некоторых ситуациях (так, во время стандартной диагностики вредного организма в странах с его широким распространением) можно одновременно тестировать несколько растений с использованием смеси образцов от различных растений. Решение о проведении тестирования одного или нескольких растений зависит от концентрации вируса в растениях и уровня достоверности, требуемого НОЗКР.

В представленном диагностическом протоколе методы (в том числе ссылки на названия торговых марок) описаны так, как они опубликованы, поскольку по ним определяется первоначальный уровень чувствительности, специфичности и/или достигнутой воспроизводимости. Представленные в протоколах лабораторные процедуры могут быть адаптированы к стандартам отдельных лабораторий, при условии, что они надлежащим образом прошли процедуру валидации.

**Выявление PPV при помощи биологических методов.** Основными растениями-индикаторами, используемыми для выявления PPV, являются сеянцы *P. cerasifera* cv. GF31, *P. persica* cv. GF305, *P. persica* x *P. davidiana* cv. Nemaguard или

*P. tomentosa*. На рисунке 8 представлены симптомы PPV на листьях и плодах *P. tomentosa*. Растения-индикаторы выращивают из семян, высаживаемых в почвенную смесь с хорошим дренажом и держат в непроницаемой для насекомых теплице при температуре от 18 °С до 25°С до тех пор, пока они не станут пригодны для прививки (обычно 25-30 см высотой и 3-4 мм в диаметре).



Рис. 8. Симптомы вируса шарки на древесном индикаторе *P. tomentosa*  
Fig. 8 Symptoms of sharka on indicator tree *P. tomentosa*

В качестве альтернативы могут быть привиты сеянцы других видов *Prunus* с индикаторами-отростками растений. Растения-индикаторы должны быть инокулированы прививкой по общепринятым методам, например окулировкой [27] с использованием, как минимум, четырех повторностей для каждого растения-индикатора. В процессе инокуляции растения-индикаторы держат в тех же условиях и на протяжении 3 недель подрезают на несколько сантиметров выше места прививки [28]. Привитые растения следует досматривать на симптомы в течение, как минимум, 6 недель. Симптомы, в частности хлоротические полосы и рисунок, можно наблюдать на отросших побегах через 3-4 недели, и их необходимо сравнивать с положительными и здоровыми контрольными образцами. Иллюстрации симптомов, вызванных PPV на растениях-индикаторах, можно найти в ряде научных трудов [21, 22, 28].

Весной и летом проводят прививки зеленым черенком. Для этого с опытного растения срезают верхушку побега (привой) бритвой, удаляют листья и делают косой срез. На подвое удаляют верхушку, накладывают привой. Место соединения обвязывают хлопчатобумажной тканью и одевают на привой пробирку для сохранения влаги и стерильности привоя. Весной и летом симптомы проявляются на персиках на 17-21-й день, на абрикосах – на 10-й день, на сливах – на 30-50-й день, при прививках зеленым черенком – в течение одного месяца, а при осенних прививках – за 7-9 месяцев. На листьях сеянцев слив появляются светло-зеленые пятна, на сеянцах абрикоса – светло-зеленые кольца и желтые полосы вдоль жилок, деформация листовой пластинки. На листьях персика – светло-зеленые пятна и посветление боковых жилок, искривления серповидного вида листовой пластинки.

Количественные данные о специфичности, чувствительности или надежности прививки не опубликованы. Данный метод широко применяется в системах сертификации и считается точным методом выявления. С учётом продолжительности теста (для развития симптомов нужно несколько недель после инокуляции), он может

использоваться только для тестирования черенков; для проведения теста нужны специальные помещения, такие как тепличные пространства с контролем температуры, а симптомы можно спутать с симптомами присутствия других вредных организмов, передающихся прививкой. Кроме того, имеются бессимптомные штаммы, не вызывающие симптомов и не обнаруживаемые на растениях-индикаторах.

Наряду с представителями рода *Prunus*, используют травянистые растения-индикаторы: *Chenopodium foetidum*, *Chenopodium quinoa*, *Cucumis sativus* 'Delikatess', *Nicotiana glutinosa*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana benthamiana*. Эти растения дают яркие симптомы поражения вирусом шарки сливы. Растения-индикаторы нужны для предварительной диагностики и изучения биологических свойств вирусов. В результате проведенных исследований на растениях-индикаторах, инокулированных соком из органов и тканей персика, абрикоса, алычи и сливы с явно выраженными симптомами поражения вирусом шарки, нами получена положительная реакция и отмечена специфичность в зависимости от вида растения-индикатора, что подтвердило наличие возбудителя вирусной инфекции – PPV (табл. 1).

**Выявление и идентификация с использованием серологических методов.** Для скрининга большого количества образцов рекомендуется твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

При приготовлении проб примерно 0,2-0,5 г свежего растительного материала измельчают на мелкие кусочки и помещают во вместительную пробирку или пластиковый пакет.

Образцы гомогенизируют примерно в 4-10 мл (1:20 w/v) в экстракционном буфере с применением электрического гомогенизатора тканей или ручного валика, молотка или похожего снаряжения. В состав экстракционного буфера входит фосфатный буфер (PBS) pH 7,2-7,4, содержащий 2% поливинилпирролидона и 0,2% диэтилдитиокарбамата натрия [15], или альтернативный буфер, прошедший валидацию. Растительный материал необходимо тщательно гомогенизировать и сразу же использовать.

**Непрямой твердофазный иммуноферментный анализ.** Непрямой твердофазный иммуноферментный анализ (DASI-ELISA), также называемый методом тройных антител (TAS)-ELISA, следует проводить в соответствии с методикой Cambra и др. [15], используя специальные моноклональные антитела, такие как 5B-IVIA, по инструкциям производителей.

5B-IVIA – это единственные моноклональные антитела, продемонстрировавшие способность обнаруживать все штаммы PPV с высокой степенью надёжности, специфичности и чувствительности [16]. В ринг-тесте DIAGPRO, в котором принимали участие 17 лабораторий, был использован набор из 10 образцов (зараженных PPV-D, PPV-M, PPV-D+M и здоровых) из Франции и Испании. DASI-ELISA с применением моноклональных антител 5B-IVIA оказался точным на 95% (количество истинно отрицательных и истинно положительных результатов от общего количества проверенных образцов). Точность данного метода была выше, чем при применении метода иммуноспецифичной обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (IC-RT-PCR) с точностью 82% и метода транскрипции-полимеразной цепной реакции с общей амплификацией (Co-RT-PCR) с точностью 94% [18, 39]. Соотношение истинно отрицательных результатов (число полученных истинно отрицательных результатов от общего количества тестируемых здоровых растений), выявленных в тесте DASI-ELISA с использованием моноклональных антител 5B-IVIA, составило 99,0% по сравнению с методами RT-PCR в режиме реального времени с использованием очищенных нуклеиновых кислот (89,2%), отпечатка тканей (98,0%) или иммуноспецифичной RT-PCR (96,1%).

Таблица 1

Идентификация *Plum pox potyvirus* у косточковых плодовых культур с применением биотеста на растениях-индикаторах

Table 1

Identification of *Plum pox potyvirus* at stone fruits by biotest using on indicator plants

Изоляты (культура, сорт)	Симптомы проявления вирусной инфекции <i>Plum pox potyvirus</i> на растениях-индикаторах				
	<i>Chenopodium foetidum</i>	<i>Chenopodium quinoa</i>	<i>Cucumis sativus</i> 'Delikatess'	<i>Nicotiana clevelandii</i>	<i>Nicotiana glutinosa</i>
5 сорто-образцов алычи	Желтовато-охровые некротические пятна по периферии на инокулированных и отросших листьях	Желтые некротические пятна, посветления жилок на инокулированных листьях	Хлоротические пятна на инокулированных листьях, переходящие в некрозы	Хлоротические и точечные некротические пятна на инокулированных и отросших листьях, деформация листовой пластинки	Хлоротические пятна на инокулированных листьях, точечные некротические пятна на отросших листьях
40 сорто-образцов персика	Желтовато-охровые некротические пятна по периферии на инокулированных листьях и некротические пятна на отросших листьях	Точечные некротические пятна на инокулированных листьях	Локальные хлоротические и некротические пятна на семядолях, отмирание семядолей	Мозаичный узор и точечные некротические пятна на инокулированных листьях	Хлоротические пятна, точечные некротические пятна на инокулированных листьях
20 сорто-образцов нектарина	Сначала хлоротические кольцевые пятна на инокулированных листьях, затем некротическая пятнистость по периферии листа, листья асимметричные	Точечные некротические пятна на инокулированных листьях	Округлые хлоротические пятна на инокулированных листьях, переходящие в некрозы	Хлоротические пятна на инокулированных листьях, переходящие в некрозы, деформация листьев	Точечный некроз тканей листа
3 сорто-образца сливы	Сначала желтые, затем некротические пятна на инокулированных листьях, хлороз жилок	Хлоротические пятна на инокулированных листьях	Системная мозаика (симптомы на инокулированных семядолях и отросших листьях)	Мозаика и деформация отросших листьев	Хлоротические пятна на инокулированных листьях, точечные некротические пятна на отросших листьях

**Твердофазный иммуноферментный анализ.** Обычные или биотин / стрептавидиновые системы DAS1-ELISA следует применять с использованием наборов на основе специфичных моноклональных антител 5B-IVIA или поликлональных антител, для которых установлена способность выявлять все штаммы PPV без перекрестной реакции с остальными вирусами и здоровым растительным материалом. Тестирование следует проводить в соответствии с инструкциями производителя.

В то время как моноклональные антитела 5B-IVIA выявляют с высокой степенью точности, чувствительности и надёжности все штаммы PPV, некоторые поликлональные антитела недостаточно специфичны и обладают ограниченной чувствительностью. Поэтому рекомендуется использовать дополнительные методы в случаях, когда применялись поликлональные антитела и НОКЗР требует дополнительного подтверждения идентификации PPV.

**Применение набора реагентов для иммуноферментного определения вируса шарки сливы (ИммуноФА-PPV-ПФ-М).** Назначение. Набор «ИммуноФА-PPV-ПФ-М» («НВО Иммунотех», Россия), или система «Пиротест», предназначен для качественного определения вируса шарки сливы в экстракте из листьев косточковых культур методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Набор рассчитан на проведение анализа 43 неизвестных образцов экстрактов, 1 образца положительного контроля, 4 образцов отрицательных контролей, в дубликатах, всего 96 определений.

Принцип работы набора. Принцип метода определения основывается на специфическом взаимодействии вируса, содержащегося в экстракте, с антигенами к вирусу, иммобилизованными на твердой фазе. Для выявления связанного вируса используют пирофосфатазный конъюгат поликлональных антител к вирусу. Количество связанного конъюгата выявляют при помощи субстрата пирофосфата натрия. После добавления стоп-реагента образцы, содержащие вирус, и положительный контроль окрашиваются в зелено-синий цвет. Интенсивность окрашивания пропорциональна количеству вируса, содержащегося в анализируемом образце. В отрицательном контроле и в образцах, не содержащих вируса, наблюдается желтое окрашивание. Изменение оптической плотности регистрируют визуально или фотометрически при длине волны 620 нм или 630 нм.

Состав набора:

- планшет 96-луночный полистирольный, с крышкой – 1 шт.;
- антитела для сорбции на планшете, концентрированные – 1 пробирка (40 мкл);
- буферный раствор для нанесения антител – 1 фл. (10 мл);
- положительный контроль на основе экстракта из листьев с высоким содержанием PPV, лиофильно высушенный – 1 фл.;
- отрицательный контроль на основе экстрактов из листьев алычи, абрикоса, персика и сливы, не содержащих вируса, лиофильно высушенный – 4 фл.;
- буферный раствор для промывки планшета (далее – «промывочный буфер»), концентрированный (10х) – 1 фл. (35 мл);
- буферный раствор для экстракции вируса («экстрагирующий буфер»), концентрированный (5х) – 1 фл. (40 мл);
- конъюгат кроличьих антител к PPV с неорганической пирофосфатазой («конъюгат»), концентрированный – 1 пробирка (40 мкл);
- ёмкость для приготовления рабочего раствора конъюгата;
- субстратный буферный раствор – 1 фл. (12 мл);
- субстрат – пирофосфат натрия – 1 пробирка (200 мкл);
- стоп-реагент, готовый к использованию – 1 фл. (11 мл).

Меры безопасности. Все компоненты набора, за исключением стоп-реагента, в используемых концентрациях не токсичны. Стоп-реагент действует на кожу и слизистые прижигающим образом, вызывая раздражения и ожоги, поэтому при попадании на кожные и слизистые покровы его следует немедленно смыть большим количеством проточной воды.

Оборудование и реагенты:

- гомогенизатор для измельчения растительных тканей;

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность раствора в лунках планшета при длине волны 620-630 нм;
- термостат суховоздушный или шейкер термостатируемый, поддерживающие температуру  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ;
- центрифуга, обеспечивающая вращение со скоростью 5-10 тыс. об/мин.;
- пипетки полуавтоматические одноканальные переменного объема с соответствующими сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы жидкости 20-200 мкл и 200-1000 мкл;
- пипетка полуавтоматическая многоканальная переменного объема со сменными наконечниками, позволяющая отбирать объемы жидкости 50-250 мкл;
- бумага фильтровальная;
- стаканы мерные химические или колбы мерные емкостью 300-500 мл;
- вода дистиллированная;
- холодильник с морозильной камерой, поддерживающей температуру не выше ( $18-20^\circ\text{C}$ ).

Приготовление реагентов. Сорбция антител на планшете. Открыть упаковку планшета и вынуть планшет с крышкой. Перенести содержимое пробирки с антителами во флакон с буферным раствором для сорбции антител. Промыть пробирку трижды полученным раствором, объединив промывочные воды. Внести во все лунки планшета по 100 мл полученного раствора. Закрыть планшет крышкой и инкубировать при температуре ( $2-8$ )  $^\circ\text{C}$  в холодильнике в течение ночи.

**Примечание.** Остальные реагенты готовят на следующий день.

Приготовление рабочего раствора промывочного буфера. Содержимое флакона с концентратом буферного раствора перенести в **химически чистую** ёмкость вместимостью 500 мл, трижды ополоснуть флакон дистиллированной водой, все промывочные воды объединить с разбавленным буфером и довести общий объем раствора до 350 мл дистиллированной водой. Рабочий раствор можно хранить в закрытой ёмкости при температуре ( $2-8$ )  $^\circ\text{C}$  не более 5 дней.

Приготовление рабочего раствора экстрагирующего буфера. Содержимое флакона с концентратом экстрагирующего буфера перенести в ёмкость вместимостью 300 – 500 мл, трижды тщательно промыть флакон дистиллированной водой, все промывочные воды объединить с разбавленным буфером и довести общий объем раствора до 200 мл дистиллированной водой. Рабочий раствор можно хранить в закрытой ёмкости при температуре ( $2-8$ )  $^\circ\text{C}$  не более 5 дней.

Приготовление положительного контроля. В содержимое флакона с положительным контролем добавить 1 мл дистиллированной воды. Неиспользованный остаток положительного контроля можно хранить замороженным при  $20^\circ\text{C}$ . Допускается только однократное замораживание и размораживание разбавленного образца положительного контроля.

Приготовление отрицательного контроля. В содержимое флакона с отрицательным контролем добавить 1 мл дистиллированной воды.

Неиспользованный остаток хранить при  $+4^\circ\text{C}$  в течение ночи или замороженным при  $-20^\circ\text{C}$ . Допускается только однократное замораживание и размораживание разбавленных образцов отрицательного контроля.

Приготовление рабочего раствора конъюгата. Содержимое пробирки растворить в 10 мл рабочего раствора промывочного буфера (п. 6.1), используя для этого соответствующую пустую ёмкость. Промыть пробирку трижды полученным раствором и объединить промывочные воды. Рабочий раствор конъюгата готовят непосредственно перед использованием, хранению не подлежит.

Приготовление рабочего раствора субстрата. Во флакон с субстратным буферным раствором добавить 200 мкл субстрата, тщательно перемешать. Готовят непосредственно перед использованием, хранению не подлежит.

Проведение анализа. Навеску листьев (0,2 г листовой ткани) гомогенизировать в 4 мл экстрагирующего буфера (готовят в соответствии с п. 6.2). Экстракт осветлить центрифугированием (5-10 тыс. об/мин., 3-5 мин).

**Примечание.** Для анализа следует использовать листья без признаков грибных или бактериальных инфекций. Лучше всего использовать свежие, полностью распустившиеся листья. Можно использовать листья, хранившиеся замороженными при температуре не выше  $-20^{\circ}\text{C}$ , при условии правильного сбора и хранения в плотно закрытом пакете, без обезвоживания и размораживания.

Вынуть планшет из холодильника и опустошить его, вытряхнув содержимое лунок в раковину.

Промыть планшет промывочным буфером 5 раз, добавляя каждый раз в лунки по 200 мкл раствора и выдерживая 1-2 мин с каждой сменой буфера. После окончания промывки тщательно удалить остатки жидкости из лунок, несколько раз промокнув планшет фильтровальной бумагой.

**Примечание.** Ванночка для промывочного буфера (при использовании многоканальной пипетки) должна быть **химически чистой**.

Внести в лунки по 100 мкл осветленного экстракта. Для каждого образца следует использовать отдельный сменный наконечник. В отдельные лунки внести по 100 мкл положительного контроля и по 100 мкл отрицательного контроля (от 1 до 4 образцов, в зависимости от вида растений, в которых проводится определение вируса).

Закрыть планшет крышкой и инкубировать 1 ч при температуре  $+37^{\circ}\text{C}$ .

**Примечание.** Из-за высокой вязкости экстрактов из листьев косточковых культур инкубация на термостатируемом шейкере (300 – 450 об/мин.) позволяет получать более надёжные результаты.

Опустошить планшет, вытряхнув содержимое из лунок в раковину, и промыть его.

**Примечание.** Убедитесь, что на дне и стенках лунок отсутствуют какие-либо признаки растительных экстрактов. При необходимости промойте планшет еще раз.

Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора конъюгата. Закрыть планшет крышкой и инкубировать 1 ч при температуре  $+37^{\circ}\text{C}$ . Опустошить планшет, вытряхнув содержимое из лунок в раковину, и промыть его. Внести во все лунки по 100 мкл рабочего раствора субстрата. Закрыть планшет крышкой и инкубировать 25 мин при температуре  $+37^{\circ}\text{C}$ . Не опустошая та не промывая планшет, добавить в каждую лунку с рабочим раствором субстрата по 100 мкл стоп-реагента и тщательно перемешать содержимое лунок на шейкере при комнатной температуре в течение 1 мин. инкубировать планшет при комнатной температуре в течение 10 мин, наблюдая за развитием окрашивания. Результат реакции оценивать визуально или фотометрически (рис. 9). Измерять оптическую плотность в лунках планшета на спектрофотометре вертикального сканирования при длине волны 620-630 нм.

**Примечание.** Допускается оценивать результат анализа на протяжении более длительного времени (1-2 ч) после внесения стоп-реагента, выдерживая планшет при комнатной температуре. Продолжение времени инкубации со стоп-реагентом обычно способствует повышению чувствительности анализа и выявлению положительных образцов с низкой концентрацией вируса. При этом содержимое лунок с отрицательными контролями должно окрашиваться в желтый цвет в течение всего времени наблюдения за развитием реакции. После появления признаков зеленого окрашивания в образцах отрицательного контроля наблюдение следует прекратить.

Оценка результатов анализа. Величина оптической плотности положительного контроля должна быть не менее 0,8 ед. опт. плот. через 10 мин инкубации со стоп-реагентом. Величина оптической плотности любого отрицательного контроля не должна превышать 0,05 ед. опт. плот. через 10 мин инкубации со стоп-реагентом. Положительными, то есть содержащими вирус, считаются образцы, средняя арифметическая величина оптической плотности которых в 3 и более раз превышает

значение оптической плотности в отрицательном контроле соответствующей косточковой культуры. Данный критерий оценки положительных образцов применяется и при более длительной инкубации со стоп-регентом при условии, что величина оптической плотности в отрицательных контролях не превышает 0,1 ед. опт. плот.

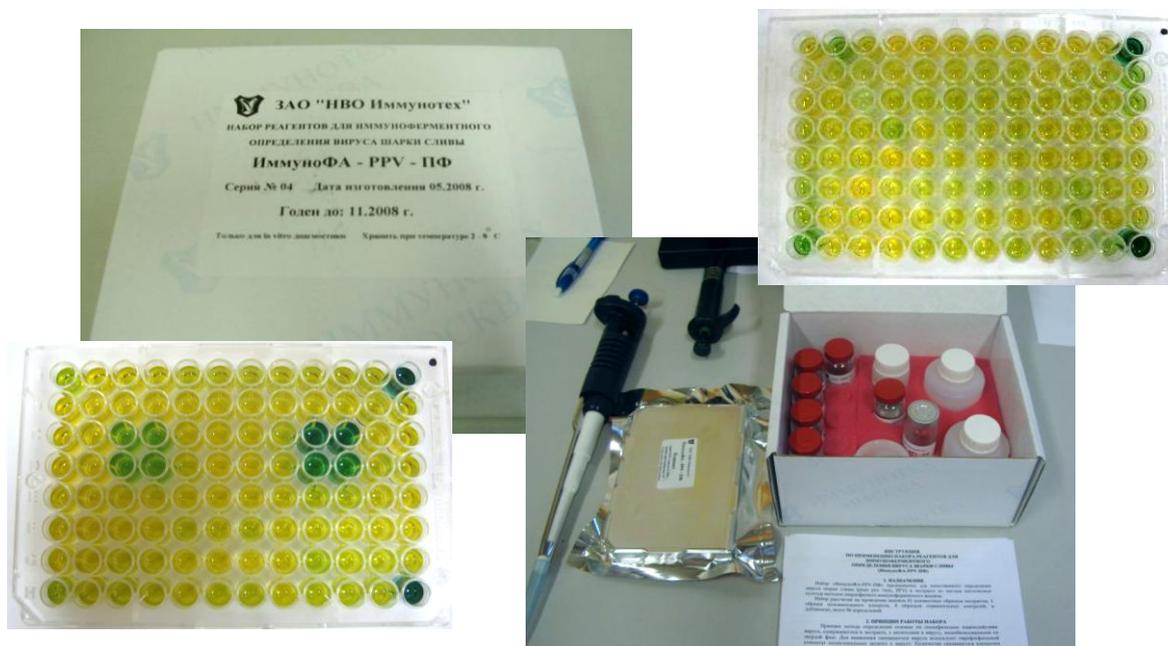
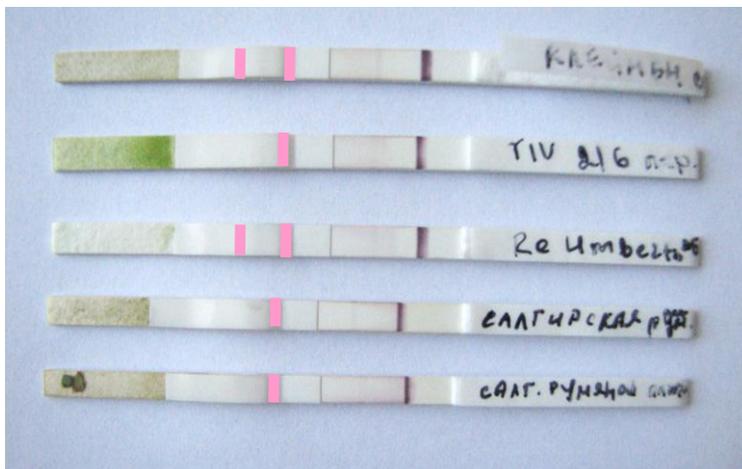


Рис. 9. Система «Пиротест-ИФА» для выявления положительной реакции на присутствие РРV  
Fig. 9 “Pirotest-IFA” system for detection a positive reaction to РРV

**Использование других наборов для ИФА.** Для детектирования вируса шарки сливы можно применять наборы ELISA Reagent set (кат. № 31505, «Agdia», США), обнаруживающие все известные штаммы вируса, по протоколу изготовителя. На планшеты MaxiSorp («Nunc», Дания) наносят антитела к РРV, растворённые 1:200 в карбонатно-бикарбонатном буфере, pH 9.6, и их инкубируют на протяжении ночи при +4°C. Планшеты промывают PBS, содержащим 0,1% Твин-20, 5 раз и вносят в лунки экстракты, приготовленные путём растирания листовой ткани в экстрагирующем буфере (PBS, 2% поливинилпирролидон («Sigma», США), 0,5% Тритон X-100, 0.1% Твин 20) в соотношении 1:20 (г/мл). Инкубируют 2 ч при 37 °С на термостатируемом шейкере Shaker ST-3 («ELM», Латвия). Планшеты промывают, как описано, и вносят конъюгат, разбавленный 1:200 буфером, входящий в состав набора. Инкубируют 1 ч на термостатируемом шейкере, промывают и вносят в лунки субстрат (1 мг/мл п-нитрофенилфосфат у 10% диэтаноламина, pH 9.8). Оптическую плотность продукта ферментативной реакции оценивают через 20 мин инкубации при 37°C на считывающем устройстве Titertek Multiscan (Eflab, Финляндия) при длине волны 405 нм. Положительной считают реакцию, в которой сигнал в лунке с анализируемым раствором в три раза превышает среднее арифметическое сигналов в отрицательных контролях.

**Диагностика вируса шарки сливы при помощи ИХА.** В настоящее время для диагностики вируса шарки сливы используют метод иммунохроматографии (ИХА) в пористых мембранах (тест-полосках). Анализ растительных экстрактов при помощи тест-полосок занимает несколько минут (рис. 10). Простота метода позволяет применять его во внелабораторных, в том числе полевых, условиях (без специальной

подготовки персонала). По эффективности выявления зараженных вирусами растений ИХА практически не уступает методу иммуноферментного анализа (ИФА) [23, 33, 40, 41]. Важным показателем надежности диагностических тест-систем ИХА является включение данного метода в диагностические протоколы Европейской организации по защите растений для определения ряда карантинных вирусов [25, 26].



**Рис. 10.** Определение вируса PPV в экстрактах из листьев сливы 'Клеймен', персика 'Бархатистый', абрикоса 'Re Umberto' и алычи 'Салгирская Румяная' методом ИХА  
**Fig. 10** PPV determination in extracts from the leaves of plum 'Kleyman', peach 'Barhatistiy', apricot 'Re Umberto' and cherry plum 'Salgirskaya Rumjanaya' by immunoassay analysis

На кафедре вирусологии МГУ им. М.В. Ломоносова были разработаны тест-полоски для экспресс-диагностики PPV на основе моноклональных антител к вирусу шарки сливы и частиц коллоидного золота в качестве маркера. Моноклональные антитела, используемые для конструирования тест-полосок, были получены российскими исследователями после иммунизации животных очищенным препаратом вируса шарки сливы, относящемся к штамму D. К тому же было выяснено, что данные тест-полоски также обнаруживают другие, антигенно отличные, штаммы вируса [13].

ИХА проводят при помощи тест-полосок. Фрагмент свежего листа массой 150-200 мг помещают в полиэтиленовый пакет размером 10x10 см и добавляют 3-4 мл экстрагирующего буфера. Листья разминают на твердой поверхности на протяжении 1 мин, 0.3-0.4 мл экстракта сливают в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и погружают в неё тест-полоску на 10 мин. Затем полоски вынимают, проводят оценку визуально, получают их цифровое изображение на сканере HP ScanJet 5300C и рассчитывают яркость аналитической зоны с использованием программы TotalLab [1].

#### **Идентификация штаммов PPV с использованием молекулярных методов.**

**Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.** Штаммы PPV-D и PPV-M идентифицируются с использованием праймеров, описанных Olmos и др. [38]:

P1 (5'-ACC GAC ACC ACT CTC CC-3')

PD (5'-CTT CAA CGA CCG TAC GC-3')

PM (5'-CTT CAA CGC CTG GT-3')

25 мкл реакционной смеси имеет следующий состав: 1 мкм праймера P1, 1 мкм праймеров PD или PM, 250 мкм dNTPs, 1 единица обратной транскриптазы AMV (10 единиц/мкл<sup>-1</sup>), 0.5 единицы ДНК Taq полимеразы (5 единиц/мкл<sup>-1</sup>), 2.5 мкл 10 х буфера для Taq полимеразы, 1.5 мМоль MgCl<sub>2</sub>, 0.3% Тритона X-100, 2% формамида и 5 мкл образца РНК. RT-PCR проводится в следующих термоциклических условиях: 45 мин при 42°C, 2 мин при 94°C, 40 циклов по 30 сек при 94°C, 30 сек при 60°C и 1 мин при 72°C с дальнейшим удержанием в течение 10 мин при температуре 72°C. Результаты

PCR анализируются при помощи гель-электрофореза. Праймеры P1/PD и P1/PM образуют ампликон 198bp. Метод был испытан с использованием шести изолятов PPV-D и четырёх изолятов PPV-M.

Штамм PPV-Rec идентифицируется с использованием праймеров mD5/mM3, специфичных к штамму PPV-Rec и описанных Šubr, Pittnerova и Glasa [43]:

mD5 (5'-TAT GTC ACA TAA AGG CGT TCT C-3')

mM3 (5'-CAT TTC CAT AAA CTC CAA AAG AC-3').

25 мкл реакционной смеси имеет следующий состав (в модификации Šubr, Pittnerova и Glasa [43]): по 1 мкм каждого праймера, 250 мкм dNTPs, 1 единица обратной транскриптазы AMV (10 единиц/мкл<sup>-1</sup>), 0.5 единицы ДНК Taq полимеразы (5 единиц/мкл<sup>-1</sup>), 2.5 мкл 10 х буфера для Taq полимеразы, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, Тритон X-100 и 5 мкл выделенной РНК.

Продукт PCR размером 605 bp анализируется при помощи гель-электрофореза.

**Метод иммуноспецифичной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией.** Реакционная смесь для PCR добавляется непосредственно в покрытые антителами пробирки PCR. Идентификация штаммов PPV-D и PPV-M проводится в соответствии с описанием в разделе 3.4.1.

**Метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией с общей амплификацией.** Для идентификации штаммов PPV-D и PPV-M используют зонды, меченные 3'DIG, специфичные к штаммам D и M [37]:

Зонд, специфичный к штамму PPV-D 5'-CTT CAA CGA CAC CCG TAC GGG CA-DIG-3'; специфичный к штамму PPV-M 5'-AAC GCC TGT GCG TGC ACG T-DIG-3'. Этапы прегибридизации и гибридизации проводятся при 50°C со стандартными буферами для прегибридизации та гибридизации + 30% формамид (для выявления штамма PPV-D) и + 50% формамид (для идентификации штамма PPV-M). Используется 2% блокирующий раствор (масса/объём).

**Метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени.** Штаммы PPV-D и PPV-M специфично идентифицируются с использованием красителя SYBR Green I согласно методике Varga и James [45] или методике с красителем TaqMan, описанной Capote и др. [20].

В методе Capote и др. [20] используются следующие праймеры и зонды TaqMan:

PPV-MGB-F праймер (5'-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3')

PPV-MGB-R праймер (5'-CAC AAT GCT GCT GCC TTC AT-3')

MGB-D зонд (5'-FAM-TTC AAC GAC ACC CGT A-MGB-3')

MGB-M зонд (5'-FAM-TTC AAC AAC GCC TGT G-MGB-3').

25 мкл реакционной смеси имеет следующий состав: 1 мкМ каждого праймера, 150 нМ FAM зонда MGB-D или MGB-M, 1 x TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems), 1 x MultiScribe и RNase Inhibitor Mix (Applied Biosystems) и 5 мкл образцов РНК3. RT-PCR проводится в следующих термоциклических условиях: 30 мин при 48°C, 10 мин при 95°C, 40 циклов по 15 с при 95°C, 60 с при 60°C. Результаты PCR анализируются в режиме реального времени в соответствии с инструкциями изготовителей. Метод был апробирован с использованием 12 изолятов PPV-D и PPV-M, а также 14 образцов, зараженных обоими штаммами одновременно.

Штаммы PPV-C, PPV-EA и PPV-W специфично идентифицируются с использованием красителя SYBR Green I согласно методу Varga и James [46]:

P1 (5'-AAC GAC ACC ACT ACA CTC CC-3')

PPV-U (5'-TGA AGG CAG CAG CAT TGA GA-3')

PPV-RR (5'-CTC TTC TTG TGT TCC GAC GTT TC-3').

Для обеспечения правильности проведения анализа рекомендуется использовать следующие праймеры внутреннего контроля:

Nad5-F (5'-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3')

Nad5-R (5'-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3').

25 мкл разбавленной смеси для RT-PCR имеет следующий состав: 2.5 мкл 1:10 (объем/объем) разбавленной в воде выделенной РНК и 22.5 мкл рабочей смеси. Рабочая смесь состоит из следующих компонентов: 2.5 мкл буфера Karsai [30] по 0.5 мкл с 5 мкМ праймеров PPV-U, PPV-RR или P1, Nad5R и Nad5F; 0.5 мкл с 10 мМ dNTPs; 1 мкл и 50 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0.2 мкл RNaseOUT™ (40 единиц/мкл<sup>-1</sup>; Introgen); 0.1 мкл Superscript™ III (200 единиц/мкл<sup>-1</sup>; Introgen); 0.1 мкл Platinum® Taq DNA полимеразы с высокой точностью (5 единиц/мкл<sup>-1</sup>; Introgen) и 1 мкл SYBR Green 1 (Sigma) в 16.1 мкл воды. Реакция протекает в следующих термоциклических условиях: 10 мин при 50°C, 2 мин при 95°C, 29 циклов по 15 сек при 95°C и 60 сек при 60°C. Анализ кривой плавления проводится путём удержания при температуре от 60°C до 95°C с шагом 0.1 °C c<sup>-1</sup> с усреднённым показателем сглаживания кривой, равным 1 единице. Температуры плавления для каждого продукта реакции следующие:

Штамм *C* (фрагмент 74bp): 79.84°C

Штамм *EA* (фрагмент 74bp): 81.27°C

Штамм *W* (фрагмент 74bp): 80.68°C

Данный метод был апробирован с использованием изолятов PPV-*C*, PPV-*D*, PPV-*EA* и PPV-*W*.

**Примечание:** Использование бренда Applied Biosystems для TaqMan Universal PCR Master Mix и MultiScribe и RNase Inhibitor Mix, а также бренда Invitrogen для RNaseOUT™, Superscript™ II и Platinum® Taq полимеразы ДНК с высокой точностью в данном диагностическом протоколе не предусматривает предоставления им предпочтения и исключение других, которые также могут применяться. Данная информация приводится для удобства пользователей этого протокола. Эквивалентные продукты могут быть использованы, если они дают те же результаты.

Проведенный анализ на выявление зараженности PPV в собранных в Крыму образцов методами ИФА и ИС-ОТ-ПЦР показал наличие вируса шарки сливы в 15 образцах (табл. 2) в коллекционных насаждениях косточковых плодовых культур в НБС-ННЦ. 14 изолятов относились к штамму *D*, 1 – к штамму *Rec*. Следует отметить, что данный изолят *Rec* впервые обнаружен на территории Крыма и на постсоветском пространстве в целом. Размеры ПЦР-продуктов, полученных с использованием универсальных и *D*-специфичных праймеров (220 и 198 пн соответственно), согласовывались с ожидаемыми. Штаммы *M*, *C*, *CR* и *W* не были обнаружены (данные ИС-ОТ-ПЦР с результатами анализа на данные штаммы не приведены).

Таким образом, из 15 изолятов PPV, обнаруженных в насаждениях косточковых культур на территории НБС-ННЦ, 14 относились к штамму *D*. Штамм *D* является наиболее распространенным штаммом вируса шарки сливы и, в отличие от других, распространен во всём мире. Он преобладает в Европе, выявлен в Азии, Африке, Северной и Южной Америке. В этой работе данный штамм впервые обнаружен также и в Крыму. Вместе с тем известно, что наиболее частыми хозяевами PPV штамма *D* являются слива и алыча. Изоляты, выявленные на персике, обычно относятся к штамму *M*. В данной работе большинство изолятов штамма *D* были выявлены на персике. Секвенирование полных геномов изолятов, относящихся к штамму *D*, показывает низкий уровень их генетической изменчивости. Вполне вероятно, что изоляты штамма *D*, выявленные в Крыму на персике, отличаются от известных и, возможно, представляют уникальную, обособленную группу в пределах этого штамма. Для выяснения данного вопроса требуется дальнейшая работа по секвенированию выявленных на персике вирусных изолятов.

На рисунке 11 а-г представлены результаты определения PPV в исследуемых образцах и типирования штамма.

Таблица 2

Результаты диагностики и идентификации PPV в растительных образцах из Крыма

Table 2

The results of PPV diagnostics and identification in Crimea plant samples

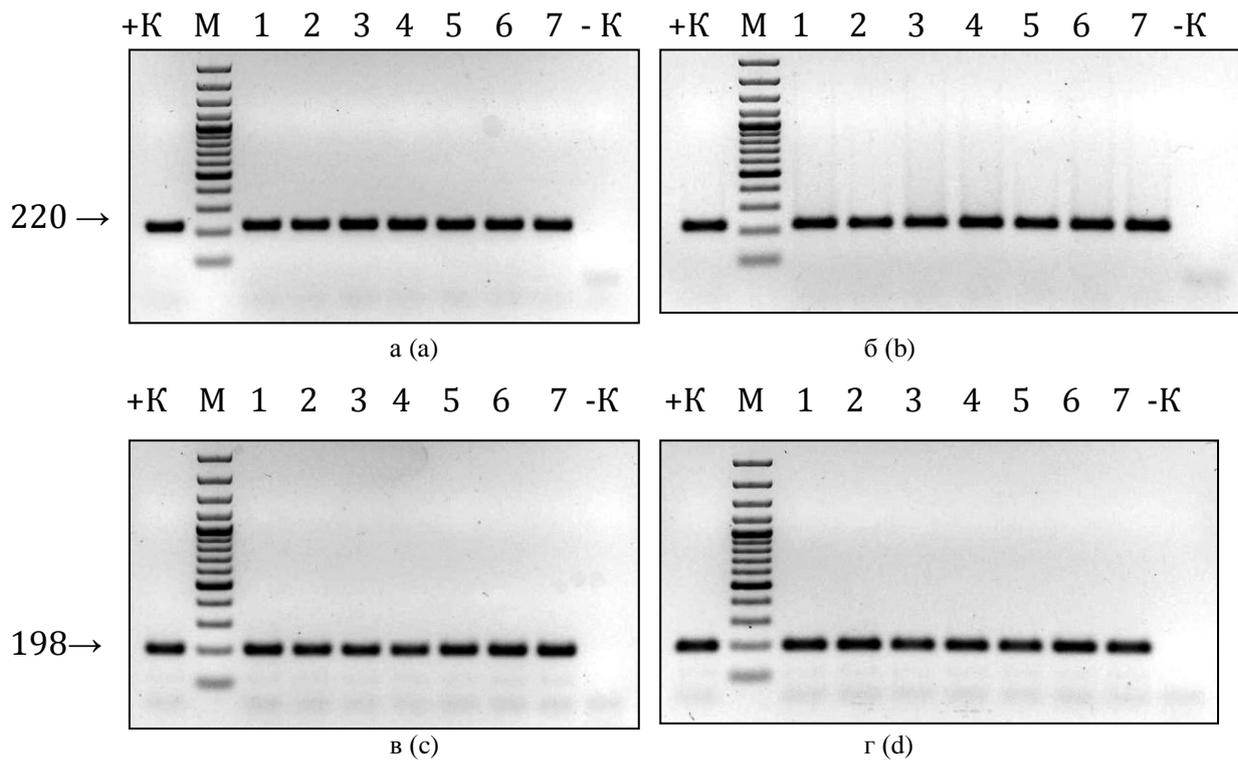
№	Растение-хозяин (вид, сорт)	Оптическая плотность продукта ИФА (А 405)	Наличие зоны 220 пн в ОТ- ПЦР	Штамм PPV
1	<i>Prunus persica</i> Золотая Москва	2,576	+	D
2	<i>P. persica</i> Слава Стевена	1,834	+	D
3	<i>P. persica</i> Мирянин x Невеста 83-878	2,637	+	D
4	<i>P. persica</i> Тюльпан	2,910	+	D
5	<i>P. persica</i> Достойный	2,220	+	D
6	<i>P. persica</i> Санбим	1,660	+	D
7	<i>P. domestica</i> Изюм Эрик	2,457	+	D
8	Лоросль под сливой Изюм Эрик	2,457	+	D
9	<i>P. domestica</i> Клеймен	2,941	+	D
10	<i>P. cerasifera</i> Пурпурная	2,625	+	D
11	<i>P. persica var. Nectarine</i> 594-81	1,660	+	D
12	Персик гибридный	2,783	+	D
13	<i>P. persica var. Nectarine</i> May Grand	2,941	+	D
14	<i>P. persica var. nectarine</i> Flavor Gold	2,316	+	D
15	Подвой <i>P. cerasifera</i>	2, 295	+	Rec
16	Отрицательный контроль Agritest	0,087	-	-
17	Отрицательный контроль – <i>P. persica</i> Орфей	0,097	-	-
18	Отрицательный контроль – <i>P. cerasifera</i> Пионерка	0,090	-	-

Важным результатом работы было выявление штамма *Rec* на алыче. Этот штамм представляет собой естественный рекомбинант между штаммами *D* и *M* в гене *NIb*, поэтому 3'-конечная часть вирусного генома (нуклеотиды 8450 – 9786) происходит от штамма *M*, а остальной геном – от штамма *D*. По этой причине изоляты, относящиеся к данному штамму, обнаруживаются в ОТ-ПЦР при помощи универсальных праймеров и праймеров, специфичных к штамму *M*. Специфичное детектирование изолятов штамма *Rec* проводится при помощи праймеров, разработанных Subr и др. [43]. На рис. 12 представлены результаты типирования изолята, выявленного на алыче, полностью отвечающие ожидаемым.

### Заключение

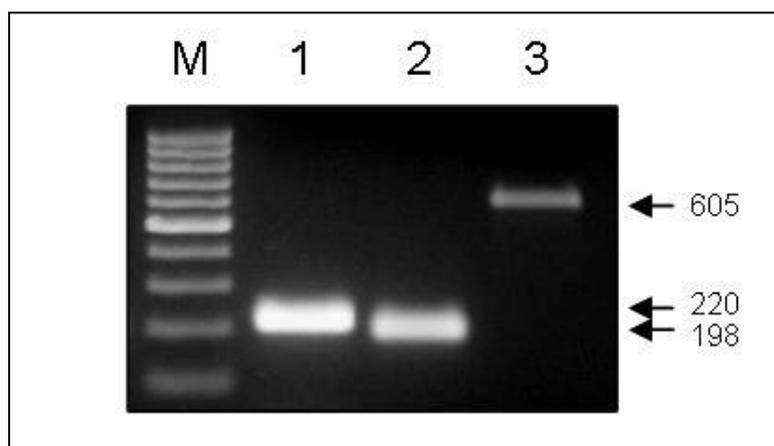
Таким образом, процедура диагностирования вируса шарки сливы и идентификации новых изолятов основывается на применении биологических, серологических и молекулярных методов анализа (рис. 13) и регламентируется диагностическим протоколом, разработанным Европейской организацией по защите растений (European and Mediterranean Plant Protection Organization, EPPO) [18, 24]. В 2012 году на VII сессии Комиссии по фитосанитарным мерам был принят доработанный и усовершенствованный диагностический протокол [<http://www.sharco.eu/var/sharco/storage/htmlarea/3244/file/ISPM%2027%20Diagnostic%20protocols%20DP2%20PPV.pdf>]. Данная методика разработана на основании этих протоколов и наработанных нами результатах многолетних исследований.

Мониторинг распространения вируса шарки в Крыму показал, что шарка распространена в ряде районов, таких как Бахчисарайский, Севастопольский, Ялтинский, Нижнегорский, Сакский. Отдельные пораженные растения встречались нам в Симферопольском, Красногвардейском, Белогорском районах. Поэтому для радикального снижения вредоносности вируса шарки сливы необходимо внедрение



**Рис. 11** Анализ штаммового разнообразия изолятов PPV методом ИС-ОТ-ПЦР с универсальными (А, Б) и штамм-*D*-специфичными праймерами. Электрофорез в 2% агарозном геле. Нумерация образцов соответствует приведенной в Таблице 2. +К – Agritest. – К – Agritest. М – маркеры молекулярной массы продуктов ПЦР (GeneRuler Plus 100 bp DNA ladder (Fermentas)). Стрелками показано расположение специфичного продукта ПЦР: 220 пар нуклеотидов (пн) для изолятов PPV с универсальными праймерами, 198 пн для изолятов штамма *D* с соответствующими праймерами

**Fig. 11** Analysis of strain diversity of PPV isolates by IC-RT-PCR with universal (A, B) and strain-*D*-specific primers. Electrophoresis in 2% agarose gel. The numbering corresponds to the samples shown in Table 2. +К - Agritest. - К - Agritest. М - molecular weight markers of PCR products (GeneRuler Plus 100 bp DNA ladder (Fermentas)). The arrows indicate the location of a specific PCR product: 220 bp for isolates of PPV with universal primers, 198 bp for isolates of strain *D* with the appropriate primers



**Рис. 12.** Анализ изолята 15 методом ИС-ОТ-ПЦР с универсальными (1), М-специфичными (2) и Рес-специфичными (3) праймерами. М – GeneRuler 100 bp DNA ladder (Fermentas).

**Fig. 12** Analysis of isolate 15 by IC-RT-PCR with universal (1), M-specific (2) and Rec-specific (3) primers. М - GeneRuler 100 bp DNA ladder (Fermentas).

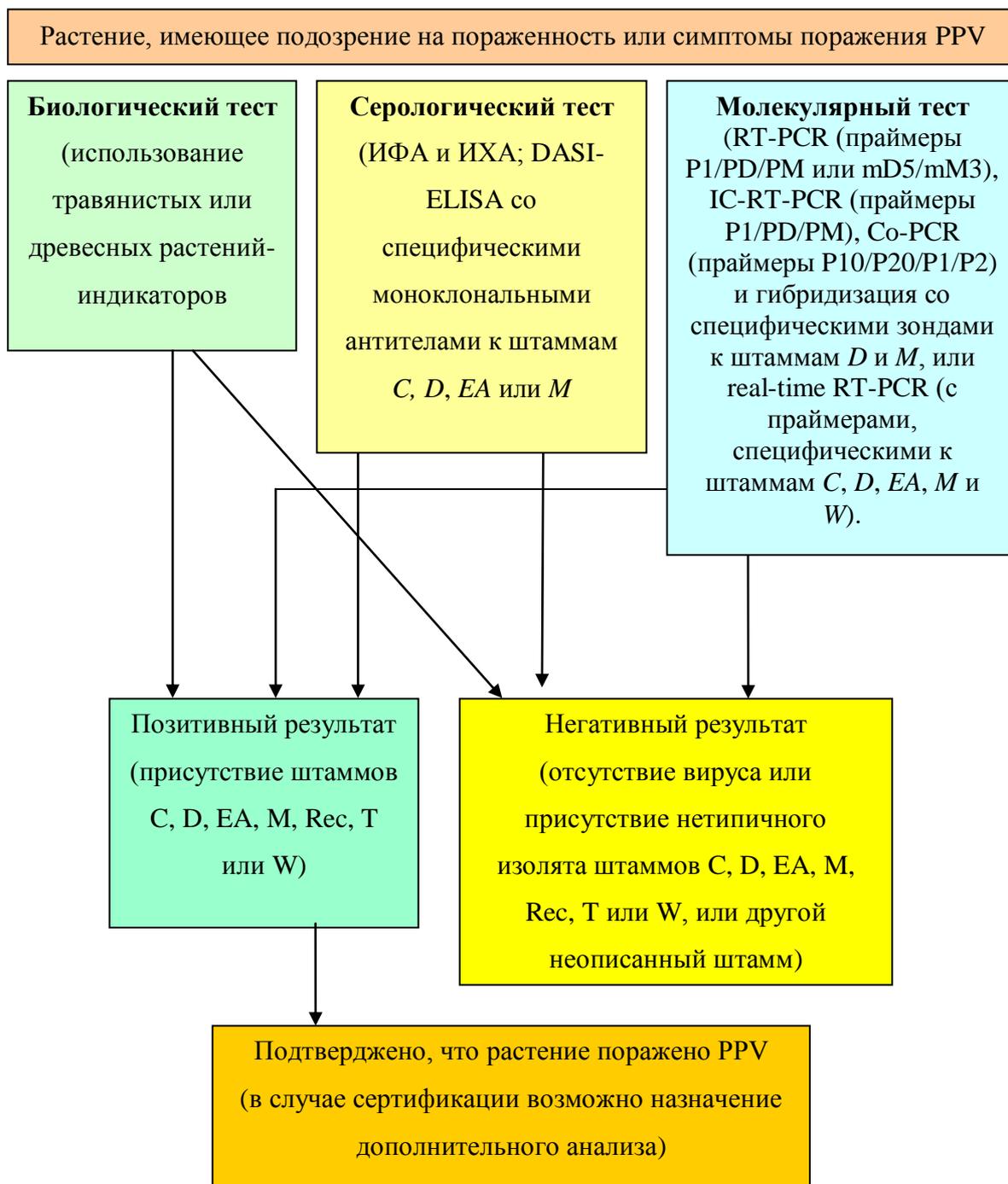


Рис. 13 Схема системы комплексного оценивания на поражаемость PPV насаждений косточковых плодовых культур

Fig. 13 Scheme of integrated assessment of susceptibility to PPV stone fruits orchards

современных биотехнологий для получения безвирусного посадочного материала косточковых плодовых культур, закладка безвирусных маточников, поиск толерантных сортов и создание методами геной инженерии устойчивых сортов персика, абрикоса, алычи и сливы.

#### Список литературы

1. Бызова Н.А., Сафенкова И.В., Чирков С.Н., Авдиенко В.Г., Гусева А.Н., Митрофанова И.В., Жердев А.В., Б.Б. Дзантиев Б.Б., Атабеков И.Г. Взаимодействие

вируса шарки сливы с антителами, конъюгированными с коллоидным золотом, и разработка иммунохроматографической системы детекции вируса // Биохимия. – 2010. – №11. – С. 1583-1595.

2. *Вредные организмы*, имеющие карантинное значение для Европы // Информационные данные по карантинным вредным организмам для Европейского союза и Европейской и Средиземноморской организации по защите растений (ЕОЗР) / Перевод с англ. – М.: Колос, 1996. – 912 с.

3. *Мартинов С., Митрофанова О., Митрофанова І.* Використання діагностичних методів для виявлення ступення ураження сортів персика вірусом шарки сливи (*Plum pox virus*) // Вісник Львівського Університету. – Серія Біологічна. – 2013. – Вип. 62. – С. 21-28.

4. *Митрофанова О.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Ходаков Г.В.* Биотехнология в селекции и оздоровлении косточковых плодовых и субтропических культур // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова / За ред. М.В. Роїка. – Київ: Логос, 2006. – Т. 3. – С. 619-624.

5. *Митрофанова О.В., Митрофанова І.В.* Биотехнология освобождения от вирусов и клональное микроразмножение декоративных и плодовых растений // Труды Никит. ботан. сада. – 2012. – Т. 134 – С. 213-227.

6. *Митрофанова О.В., Митрофанова І.В.* Вирусы субтропических и косточковых плодовых культур и биотехнологические приемы оздоровления растений // Біоресурси та віруси: II Міжнародна конференція. – Київ, 7-10 вересня 1998 р. – Київ: Фітосоціоцентр, 1998. – С. 94.

7. *Митрофанова О.В., Митрофанова І.В., Ежов В.Н., Лесникова-Седошенко Н.П., Лукичева Л.А., Смыков А.В., Сенин В.В., Литвинова Т.В.* Изучение вирусов и вирусных болезней косточковых плодовых культур на юге Украины и особенности оздоровления растений *in vitro* // Бюл. Никит. ботан. сада. – 2005. – Вып. 91 – С. 1-12.

8. *Митрофанова О.В., Митрофанова І.В., Чирков С.Н., Ежов В.Н., Лесникова-Седошенко Н.П.* Биотехнологические системы диагностики вируса шарки сливы (*Plum pox virus*) и отбора толерантных сортов косточковых плодовых культур // Сб. науч. труд. Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 94-103.

9. *Митрофанова О.В., Славгородская-Курпиева Л.Е., Митрофанова І.В., Лукичева Л.А.* Диагностика вирусных болезней и биотехнологические приемы получения безвирусного посадочного материала косточковых плодовых культур. – Ялта: Крымпресс. – 2000. – 45 с.

10. *Омелюта В.П., Устінова А.Ф., Устінов І.Д.* Карантинні об'єкти // Захист рослин. – 1997. – № 3. – С.4-5.

11. *Пискун Н.И.* «Шарка» слив на Украине // Защита растений. – 1969. – № 6. – С. 54.

12. *Ратушняк Л.К.* Розповсюдженість шарки сливи в Україні // Вісник аграрної науки південного регіону. Сільськогосподарські та біологічні науки. – Одеса: СМІЛ, 2003. – Вип. 4. – С. 156-163.

13. *Чирков С.Н., Бызова Н.А., Шевелева А.А., Митрофанова І.В., Приходько Ю.Н., Дзантиев Б.Б., Атабеков И.Г.* Испытание отечественных иммунохроматографических тест-полосок для экспресс-диагностики вируса шарки сливы // Сельскохозяйственная биология. – 2012. – № 1. – С. 110-116.

14. *Budzanivska I., Usko L., Gospodaryk A., Melnyk M., Polischuk V.* Epidemiology of sharka disease in Ukraine // Acta Hort. – 2011. – 899. – P. 57-63.

15. *Cambra M., Asensio M., Gorris M.T., Pérez E., Camarasa E., García J.A., Moya J.J., López-Abella D., Vela C. & Sanz A.* Detection of *Plum pox potyvirus* using monoclonal

antibodies to structural and non-structural proteins // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 1994. – 24. – P. 569–577.

16. Cambra M., Boscia D., Myrta A., Palkovics L., Navrátil M., Barba M., Gorris M.T., Capote N. Detection and characterization of *Plum pox virus*: serological methods // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2006. – 36. – P. 254–261.

17. Cambra M., Capote N., Myrta A., Llacer G. *Plum pox virus* and the estimated costs associated with sharka disease // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2006. – 36. – P. 202–204.

18. Cambra M., Capote N., Olmos A., Bertolini E., Gorris M.T., Africander N.L., Levy L., Lenardon S.L., Clover G., Wright D. Proposal for a new international protocol for detection and identification of *Plum pox virus*. Validation of the techniques // Acta Hort. – 2006. – N 781. – P. 181–191.

19. Candresse T., Cambra M. Causal agent of sharka disease: historical perspective and current status of *Plum pox virus* strains // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2006. – 36. – P. 239–246.

20. Capote N., Gorris M.T., Martínez M.C., Asensio M., Olmos A., Cambra M. Interference between *D* and *M* types of *Plum pox virus* in Japanese plum assessed by specific monoclonal antibodies and quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction // Phytopathology. – 2006. – 96. – P. 320–325.

21. Damsteegt V.D., Scorza R., Stone A.L., Schneider W.L., Webb K., Demuth M., Gildow F.E. *Prunus* host range of *Plum pox virus* (PPV) in the United States by aphid and graft inoculation // Plant Disease. – 2007. – 91. – P. 18–23.

22. Damsteegt V.D., Waterworth H.E., Mink G.I., Howell W.E., Levy L. *Prunus tomentosa* as a diagnostic host for detection of *Plum pox virus* and other *Prunus* viruses // Plant Disease. – 1997. – 81. – P. 329–332.

23. Danks C., Barker I. On-site detection of plant pathogens using lateral flow devices // EPPO Bulletin. – 2000. – 30. – P. 421–426.

24. Diagnostic protocol for regulated pests. *Plum pox virus* // EPPO Bulletin. – 2004. – 34. – P. 247–256.

25. Diagnostic protocols for regulated pests. *Tomato spotted wilt tospovirus*, *Impatiens necrotic spot tospovirus* and *Watermelon silver mottle tospovirus* // EPPO Bulletin. – 2004. – 34. – P. 271–279.

26. Diagnostic protocols for regulated pests. *Beet necrotic yellow vein virus* (*benyvirus*) // EPPO Bulletin. – 2006. – 36. – P. 429–440.

27. Desvignes J.C. Virus diseases of fruit trees.. – Paris: CTIFL: Centr'imprint, 1999. – 202 p.

28. Gentil P. Detection of *Plum pox virus*: biological methods // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2006. – 36. – P. 251–253.

29. James D., Glasa M. Causal agent of sharka disease: New and emerging events associated with *Plum pox virus* characterization // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2006. – 36. – P. 247–250.

30. Karsai A., Müller S., Platz S., Hauser M.T. Evaluation of a homemade SYBR Green I reaction mixture for real-time PCR quantification of gene expression // Biotechniques. – 2002.. – 32. – P. 790–796.

31. Kondratenko P., Udovichenko V. *Plum pox virus* (PPV) in Ukraine // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2006. – 36. – P. 217.

32. Kunze L., Krczal H. Transmission of sharka virus by aphids // Fruit Tree Virus diseases: 8th European Symposium, Paris, France, 1971. – Paris: INRA, 1971. – P. 255–260.

33. Kusano N., Hirashima K., Kuwahara M., Narahara K., Imamura T., Mimori T., Nakahira K., Torii K. Immunochromatographic assay for simple and rapid detection of

*Satsuma dwarf virus* and related viruses using monoclonal antibodies // J. Gen. Plant Pathol. – 2007. – 73. – P. 66-71.

34. Labonne G., Dallot S. Epidemiology of sharka disease in France // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. – 2006. – 36. – P. 267-270.

35. Maejima K., Hoshi H., Hashimoto M., Himeno M., Kawanishi T., Komatsu K., Yamaji Y., Hamamoto H., Namba S. First report of *Plum pox virus* infecting Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) // Japan. J. Gen. Plant Pathol. – 2010. – 76. – P. 229-231.

36. Norkus T., Staniulis J., Žižyte M., Melnyk M., Yusko L., Snihur H., Budzavinska I., Polischuk V. Molecular identification of *Plum pox virus* isolates from Lithuania and Ukraine // Zemdirbyste-Agriculture. – 2008. – Vol. 95, № 3. – P. 277-285.

37. Olmos A., Bertolini E., Cambra M. Simultaneous and co-operational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses // Journal of Virological Methods. – 2002. – 106. – P. 51-59.

38. Olmos A., Cambra M., Dasi M.A., Candresse T., Esteban O., Gorris M.T., Asensio M. Simultaneous detection and typing of *Plum pox potyvirus* (PPV) isolates by heminested-PCR and PCR-ELISA // Journal of Virological Methods. – 1997. – 68. – P. 127-137.

39. Olmos A., Capote N., Bertolini E., Cambra M. Molecular diagnostic methods for plant viruses / Eds. Z.K. Punja, S. DeBoer, H. Sanfacon // Biotechnology and plant disease management: pp. 227-249. – Wallingford: UK and Cambridge: USA: CAB International, 2007. – 574 p.

40. Salomone A., Mongelli M., Roggero P., Boscia D. Reliability of detection of *Citrus tristeza virus* by an immunochromatographic lateral flow assay in comparison with ELISA // J. Plant Pathol. – 2004. – 86. – P. 43-48.

41. Salomone A., Roggero P. Host range, seed transmission and detection by ELISA and lateral flow of an Italian isolate of pepino mosaic virus // J. Plant Pathol. – 2002. – 84. – P. 65-68.

42. Sochor J., Babula P., Adam V., Krska B., Kizek R. Sharka. The Past, The Present and The Future // Viruses. – 2012. – 4. – P. 2853-2901.

43. Šubr Z., Pittnerova S., Glasa M. A simplified RT-PCR-based detection of recombinant *Plum pox virus* isolates // Acta Virologica. – 2004. – 48. – P. 173-176.

44. Ulubaş Serçe Ç., Candresse T., Svanella-Dumas L., Krizbai L., Gazel M., Çağlayan K. Further characterization of a new recombinant group of *Plum pox virus* isolates, PPV-T, found in the Ankara province of Turkey // Virus Research. – 2009. – 142. – P. 121-126.

45. Varga A., James D. Detection and differentiation of *Plum pox virus* using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: a rapid method for strain typing // Journal of Virological Methods. – 2005. – 123. – P. 213-220.

46. Varga A., James D. Real-time RT-PCR and SYBR Green I melting curve analysis for the identification of *Plum pox virus* strains C, EA, and W: Effect of amplicon size, melt rate, and dye translocation // Journal of Virological Methods. – 2006. – 132. – P. 146-153.

**Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Chirkov S.N., Lesnikova-Sedoshenko N.P. Methodological approaches to Sharka (*Plum pox virus*) detection and identification on the different species of genus *Prunus* // Works of the State Nikit. Botan. Gard. – 2014. – V. 138. – P. 137-161.**

The methodical approach and the results of long-term research concerning the monitoring the spread of sharka virus (*Plum pox virus*) in the south of Ukraine and Crimea have been presented. The paper contains the information about the pest and symptoms of disease caused by *Plum pox virus*. The characteristic of *Plum pox virus* and features of phytopathogen identification have been recorded. Basic techniques of *Plum pox virus* identification have been demonstrated: a biological method, ELISA-test, immunoassay analysis and PCR-analysis.

**Key words:** *Plum pox virus*, monitoring, symptoms, identification methods.

## СОДЕРЖАНИЕ

Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Иванова Н.Н., Лесникова-Седошенко Н.П. Применение биотехнологических методов в оздоровлении растений и размножении безвирусного посадочного материала перспективных цветочно-декоративных культур .....	5
Иванова Н.Н., Митрофанова И.В., Митрофанова О.В. Методические основы клонального микроразмножения некоторых декоративных культур.....	57
Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Корзина Н.В., Лесникова-Седошенко Н.П., Иванова Н.Н., Тевфик А.Ш., Пилипчук Т.И., Заяц А.Ю., Челомбит С.В., Мелихова Г.И. Методические аспекты в исследовании органогенеза и соматического эмбриогенеза <i>in vitro</i> представителей семейств Ranunculaceae, Cannaceae, Moraceae, Rosaceae, Myrtaceae, Oleaceae, Actinidiaceae.....	102
Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Чирков С.Н., Лесникова-Седошенко Н.П. Методические подходы к выявлению и идентификации вируса шарки сливы ( <i>Plum pox virus</i> ) на разных видах представителей рода <i>Prunus</i> .....	137

## CONTENTS

Mitrofanova O.V., Mitrofanova I.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Ivanova N.N. Using of biotechnology methods for plants improvement and propagation of virus-free planting material of perspective ornamental plants .....	5
Ivanova N.N., Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V. Methodical base of clonal micropropagation of some ornamental plants.....	57
Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Korzina N.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Ivanova N.N., Tevfik A.Sh., Pilipchuk T.I., Zaiats A.Yu., Chelombit S.V., Melihova G.I. Methodological aspects in the study of organogenesis and somatic embryogenesis <i>in</i> <i>vitro</i> of representatives in families Ranunculaceae, Cannaceae, Moraceae, Rosaceae, Myrtaceae, Oleaceae, Actinidiaceae.....	102
Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V., Chirkov S.N., Lesnikova-Sedoshenko N.P. Methodological approaches to Sharka ( <i>Plum pox virus</i> ) detection and identification on the different species of genus <i>Prunus</i> .....	137

# МЕТОДОЛОГИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И ВИРУСОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЦЕННЫХ МНОГОЛЕТНИХ КУЛЬТУР

Сборник научных трудов ГНБС

Том 138

Ответственный за выпуск

Шишкин В.А.

Компьютерная верстка

Митрофанова И.В.

<http://www.nbgns.com>

Свидетельство о государственной регистрации КВ № 3466 от 09.09.98 г.  
Подписано в печать 14.11.2014 года. Формат 210 x 297. Бумага офсетная – 80 г/м<sup>2</sup>.  
Печать ризографическая. Уч.-печат. л. 10. Тираж 500 экз. Заказ № 000.

Редакция научных изданий

Никитский ботанический сад

пгт. Никита, г. Ялта, Республика Крым, РФ, 298648

Телефон: (0654) 33-56-16

E-mail: [redaknbg@yandex.ru](mailto:redaknbg@yandex.ru)

Отпечатано с оригинал-макета в типографии ФЛП Бражникова Д.А.,

295034, Республика Крым, г. Симферополь, ул. Оленчука, 63

тел. (0652) 70-63-31, +7 978 717 29 01.

E-mail: [braznikov@mail.ru](mailto:braznikov@mail.ru)