

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.

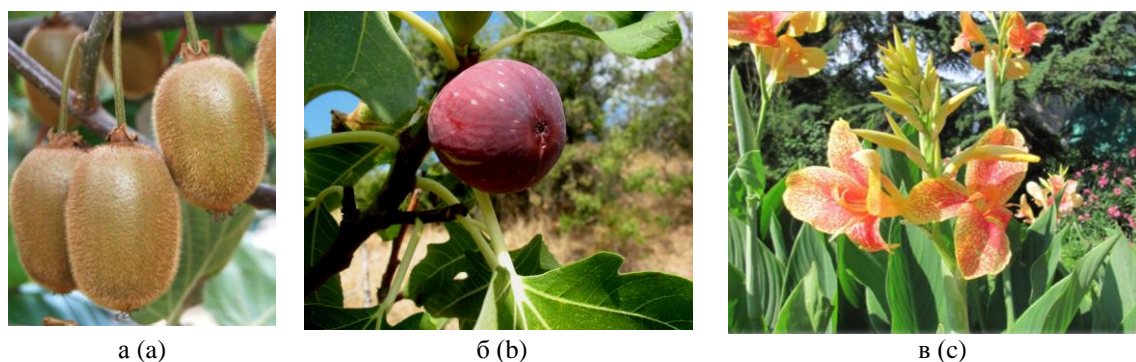


Рис. 1 Исходные растения киви (а), инжира (б) и канны садовой (в) для введения в условия *in vitro*
 Fig. 1 Donor plants of *Actinidia deliciosa* (a), *Ficus carica* (b) and *Canna × hybrida hort.* (c) for *in vitro* introduction

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 – Синдерелла. 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. Травя 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 (Φ_1 и Φ_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 достигнуть 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% C₂H₅OH, 7-25 мин 0,375 – 1,125% Cl₂ («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), тидазурон (ТДЗ) и ауксинового – α-нафтилуксусная кислота (НУК), β-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 (ГК₃, «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⁻¹

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

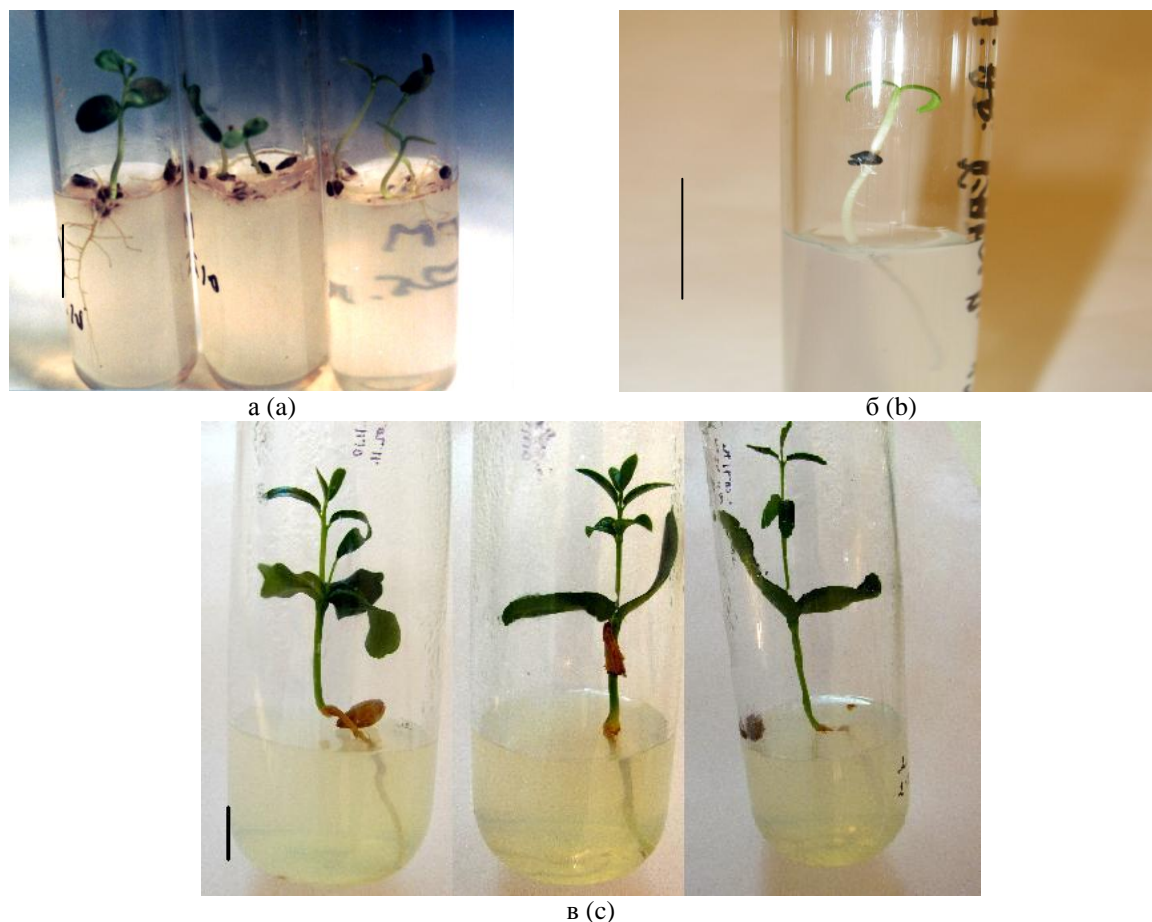


Рис. 5 Развившиеся проростки в условиях *in vitro*: а) из семян киви; б) из семени фейхоа; в) из зародышей маслины (масштаб 1 см)
Fig. 5 Seedlings developed *in vitro*: а) from seeds of kiwi; б) from seed of feijoa; в) from embryos of olive (Bar 1 cm)

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).

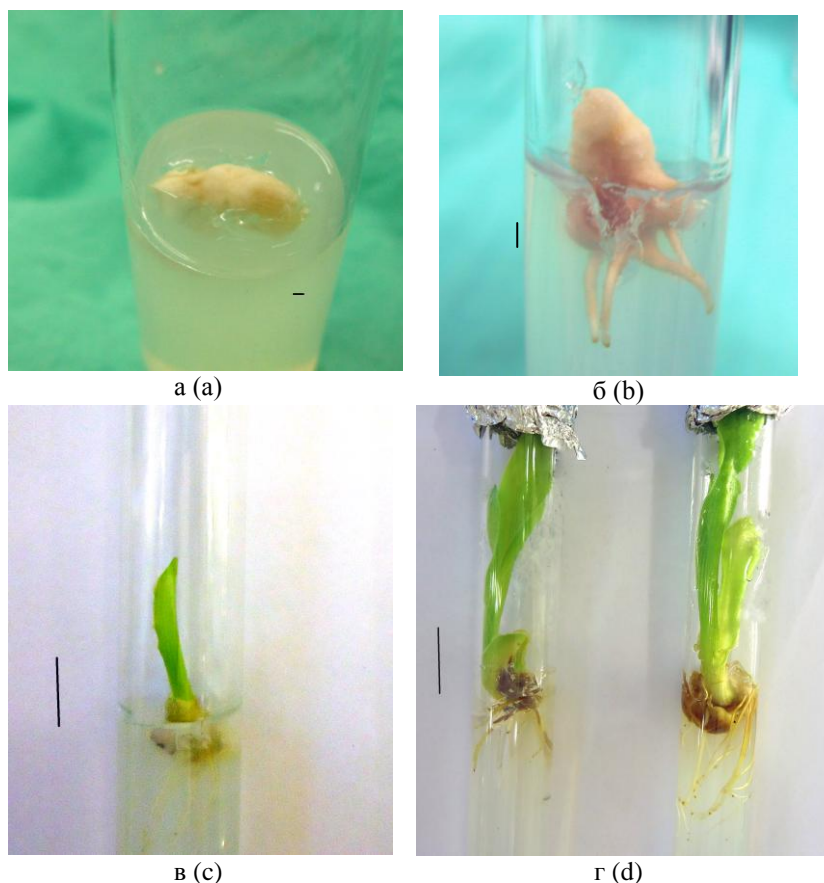


Рис. 6 Прямой органогенез из зародышей канны садовой сорта Дар Востока: а) зародыш на питательной среде Монье; б) рост корней у зародыша (масштаб 1 мм); в) развитие зародышей канны при культивировании в стандартных условиях на 6-8 сутки; г) на 30-е сутки (масштаб 1 см)
Fig. 6 Direct organogenesis of 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).

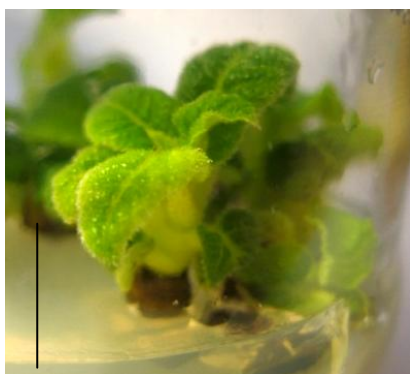


Рис. 8 Регенерация адвентивных микропобегов из листовых дисков киви сорта Сааништон (масштаб 1 см)

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.

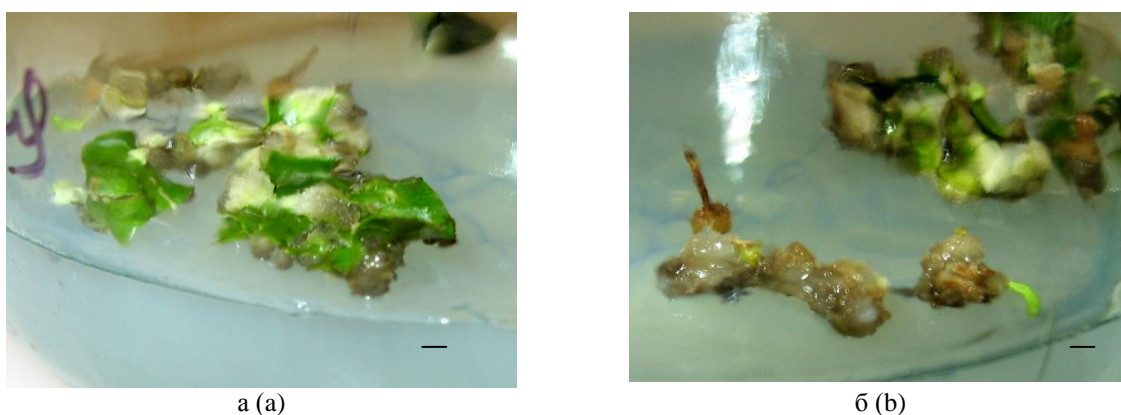


Рис. 9 Морфогенный и неморфогенный каллус, полученный из эксплантов листа и сегментов микропобега фейхоа сорта Никитская Ароматная и гибридной формы Ф2 после 30 суток культивирования (масштаб 1 мм)

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



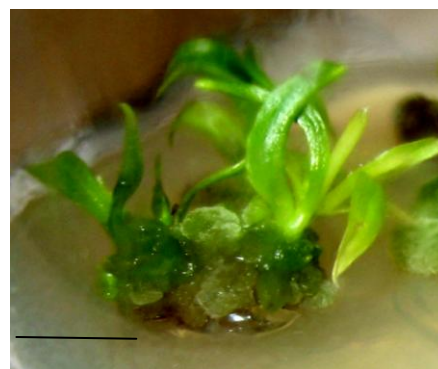
Рис. 10 Индукция каллусогенеза и прямого органогенеза в культуре листовых эксплантов инжира на питательной среде с 2,0-2,5 мг/л ТДЗ

Fig. 10 Callusogenesis and direct organogenesis induction in leaf explants culture of fig on media with 2,0-2,5 mg l⁻¹ 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 (a)



б (b)

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).

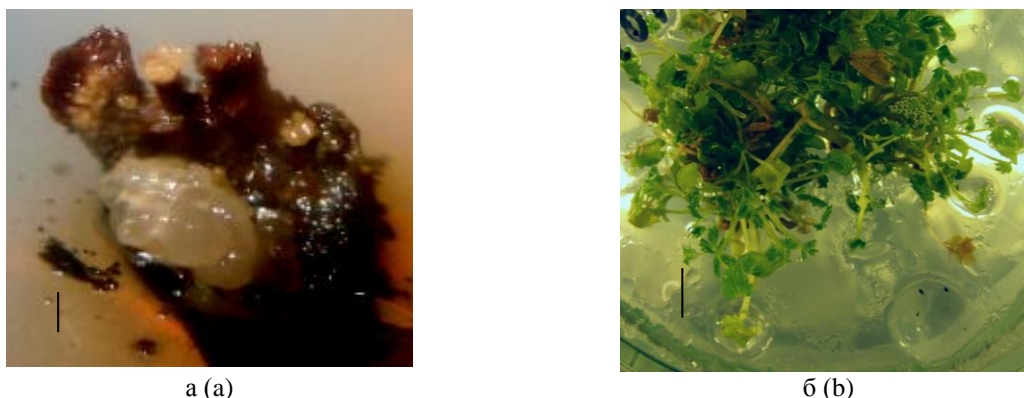


Рис. 12 Формирование эмбрионного каллуса в культуре листовых дисков *P. recta*, масштаб 1 мм (а) и регенерация микропобегов в каллусе листового происхождения *P. canescens*, масштаб 1 см (б)
 Fig. 12 Embryogenic callus formation in leaf discs culture *P. recta*, Bar 1 mm (a) and microshoots regeneration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

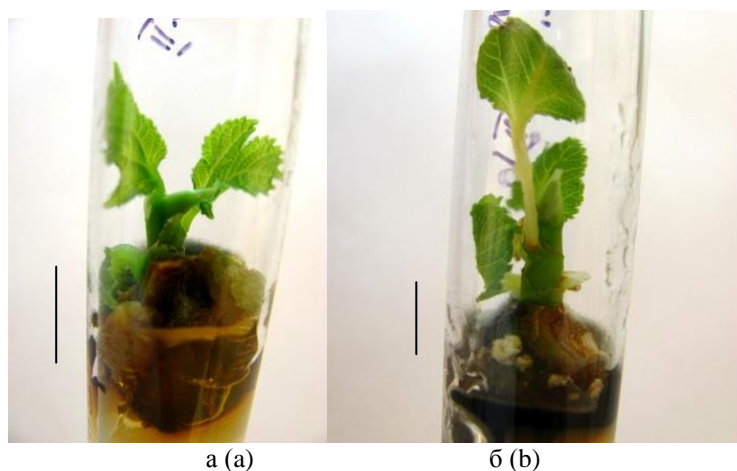


Рис. 14 Раздвижение листьев у вегетативных почек инжира в первую неделю культивирования (а) и развитие микропобега на 14-21 сутки в условиях *in vitro* (б), масштаб 1 см
Fig. 14 Leaf out of Fig vegetative buds at the first week of culture (a) and microshoots development at 14-21 hours under conditions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

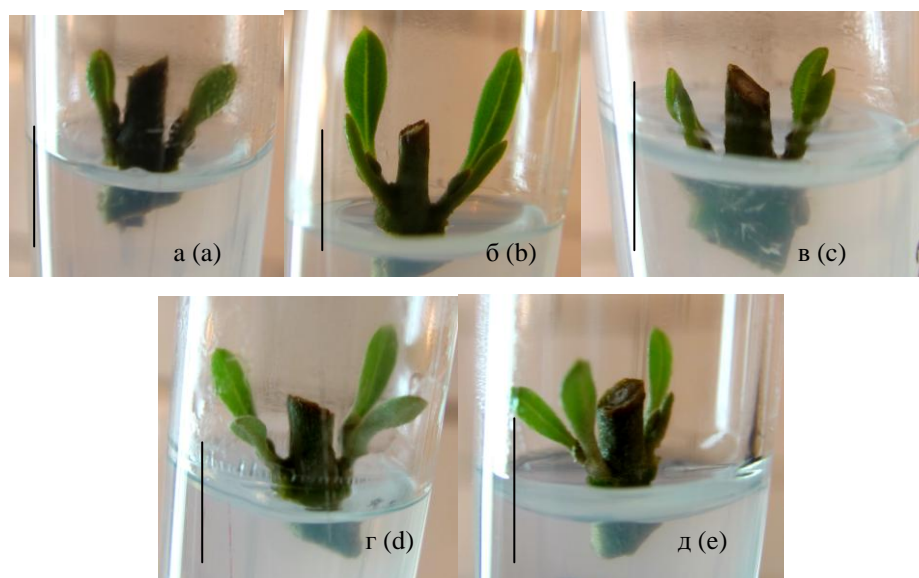


Рис. 15 Экспланты сортов Ломашенская (а), Толгомская (б), Крымская Превосходная (в), Никитская (г) и Никитская Крупноплодная (д) спустя 3 недели культивирования на среде WPM (масштаб 1 см)
Fig. 15 Explants of cvs. Lomashenskaya (a) Tolgomskaya (b), Krimskaya Prevoshodnaya (c), (d) and Nikitskaya Krupnoplodnaya (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 ГК₃ 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.

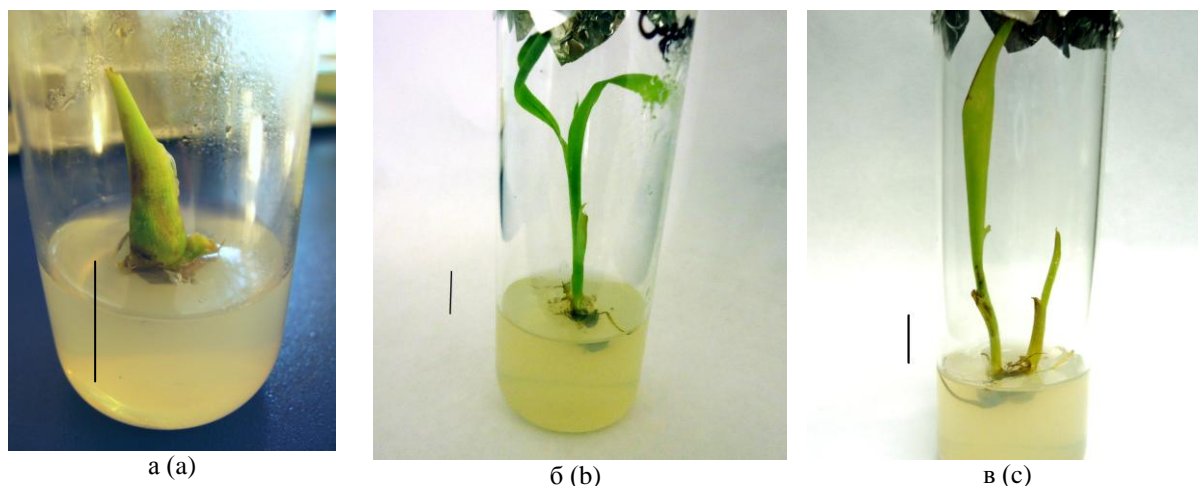


Рис. 16 Регенерация растения из вегетативной почки у канны садовой сорта Суевия: а) развитие вегетативной почки на 7-е сутки культивирования; б) формирование растения на 35-е сутки культивирования; в) адвентивное побегообразование (масштаб 1 см);
Fig. 16 Plant regeneration from vegetative bud of *Canna*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

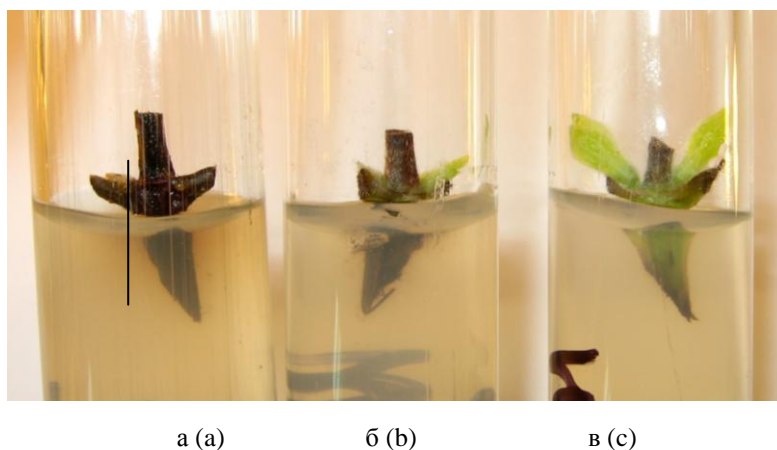


Рис. 17 Развитие первичных эксплантов клематиса сорта Юность: а) через сутки после введения; б) через 3 суток; в) через 7 суток культивирования (масштаб 1 см)
Fig. 17 The development of primary explants in *Clematis* cv. Yunosty: a) the day after the introduction; b) at 3 days; c) after 7 days of culture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

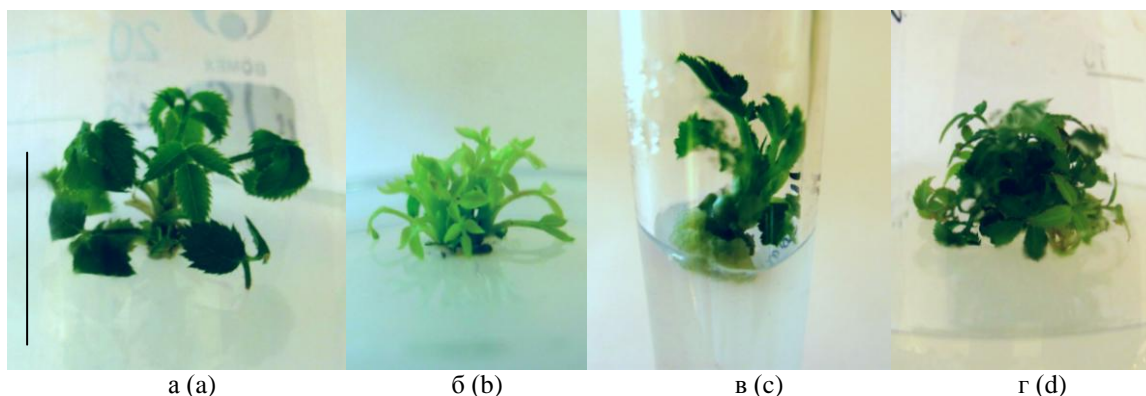


Рис. 18 Развитие микропобегов из вегетативных почек сортов розы миниатюрной: а) Гранатовый Браслет, б) Мальчик-с-пальчик, в) Мандарин; Рулети (масштаб 1 см)

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).

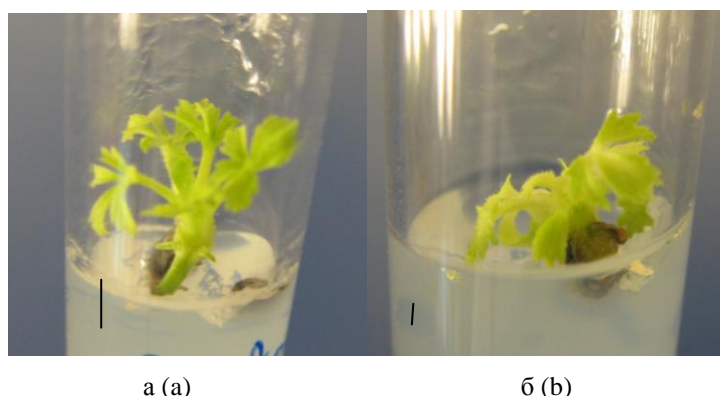


Рис. 19 Развитие микропобегов *P. depressa* (а) и *P. canescens* (б) на питательной среде МС, дополненной 0,1 мг/л кинетина или 0,5 мг/л БАП и 0,01 мг/л НУК (масштаб 1 мм)

Fig. 19 Microshoots of *P. depressa* (a) and *P. canescens* (b) development on MS culture medium with 0,1 mg l⁻¹ or 0,5 mg l⁻¹ and 0,01 mg l⁻¹ 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.

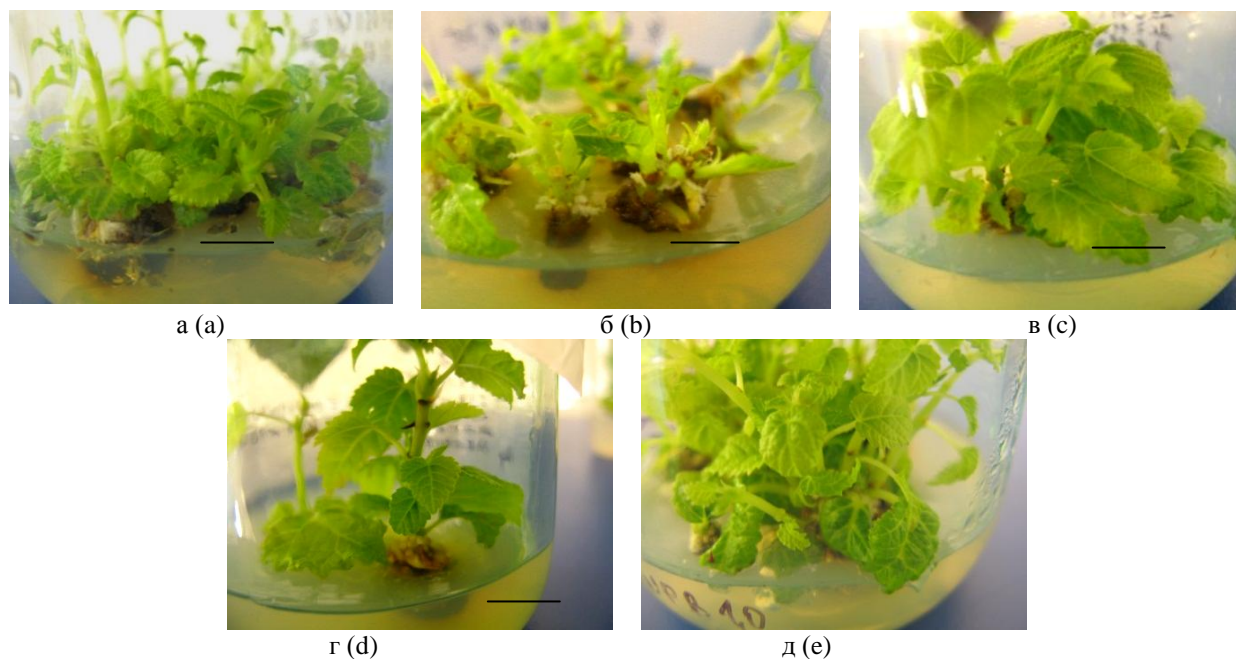


Рис. 21 Образование множественных микропобегов у некоторых сортов инжира: а) Смена, б) Желтоплодный, в) Сабруция Розовая, г) Белый Ранний, д) Лимонно-Желтый (масштаб 1 см)
Fig. 21 Multiple microshoots formation of some cultivars of figs: a) Smena, b) Zheltoplodniy, c) Sabrucia Rozovaya, d) Belyy Ranniyy,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

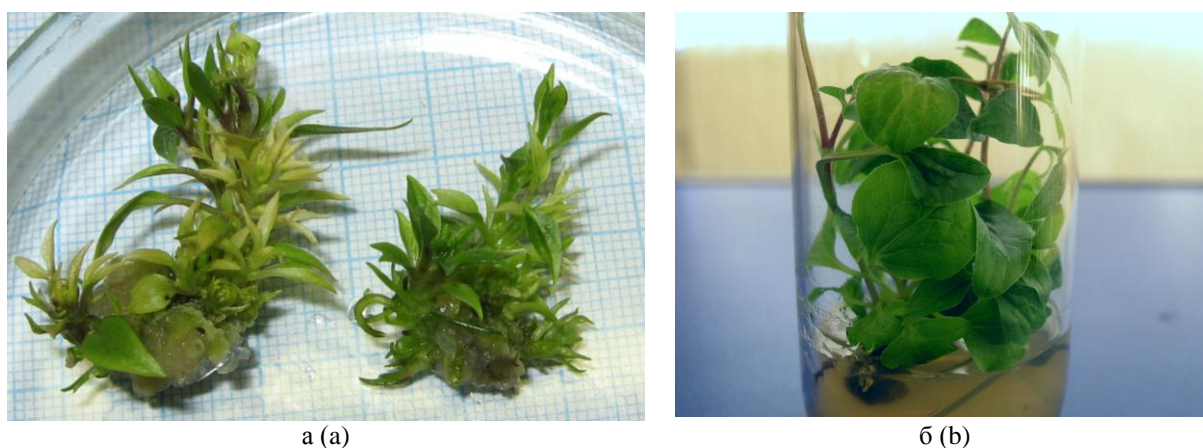


Рис. 22 Активная регенерация микропобегов у сортов клематиса Multi Blue (а) и Аленушка (б)
Fig. 22 Active regeneration of microshoots of Clematis cvs. Multi Blue (a) and Alenushka (b)

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).

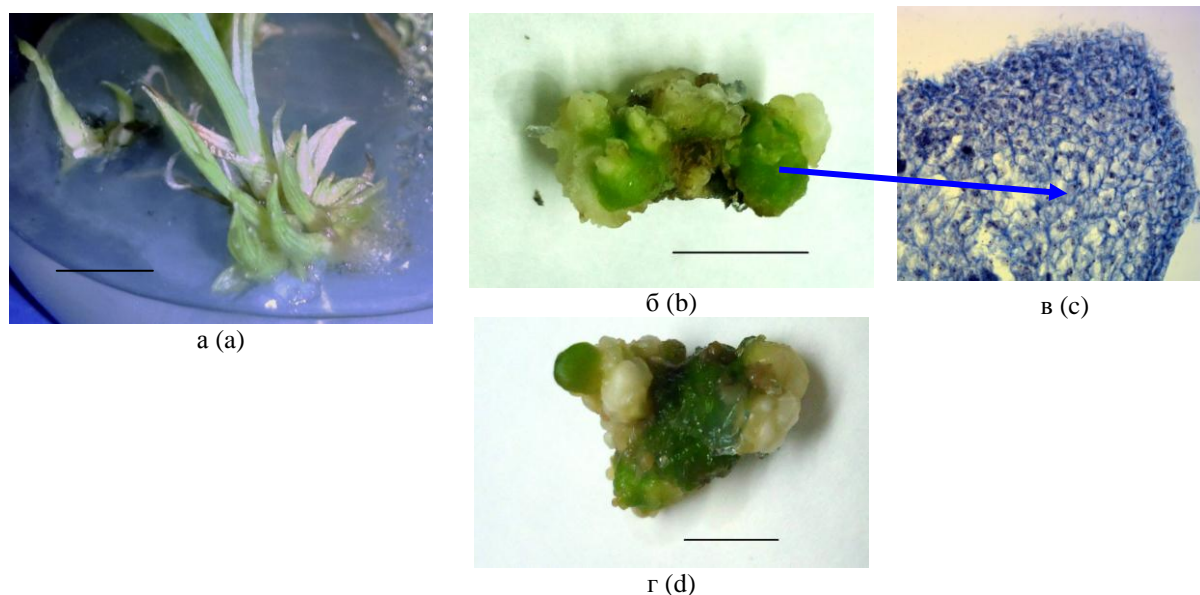


Рис. 23 Прямая регенерация микропобегов (а) и массовое формирование меристемоидов канны садовой сортов Суевия (б, в) и Ливадия (г), масштаб 1 см
 Fig. 23 Direct regeneration of microshoots (a) and mass meristemoid formation of *Canna* cvs. Suevia (b, c) and Livadia (d), Bar 1 cm

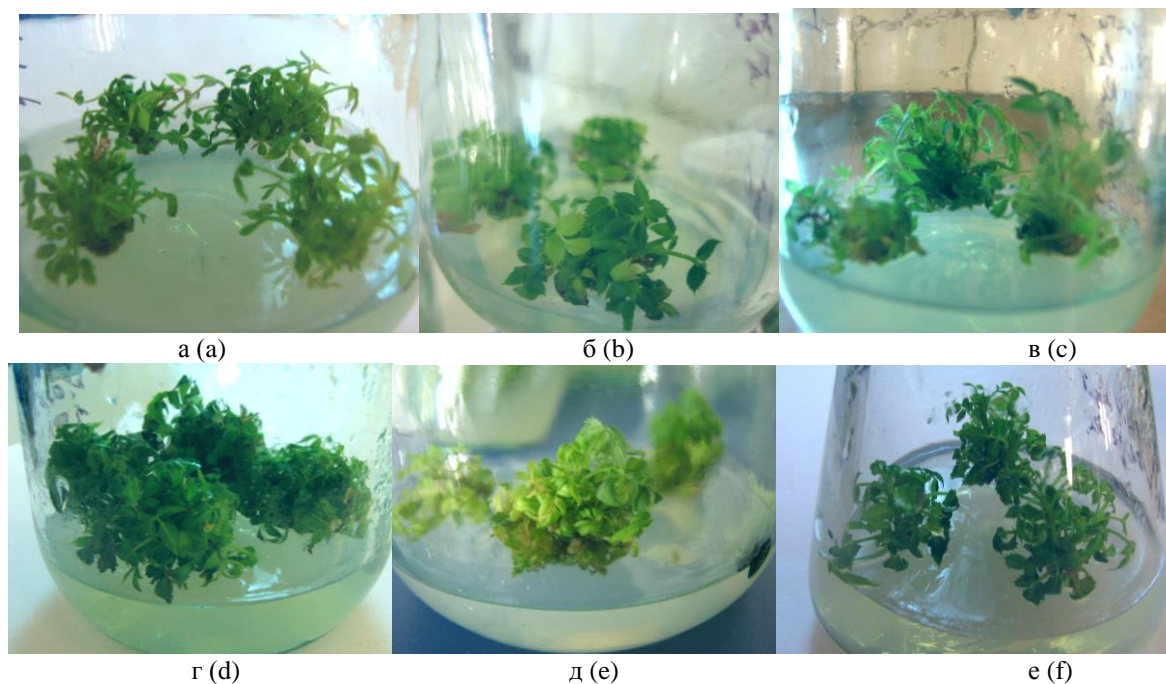
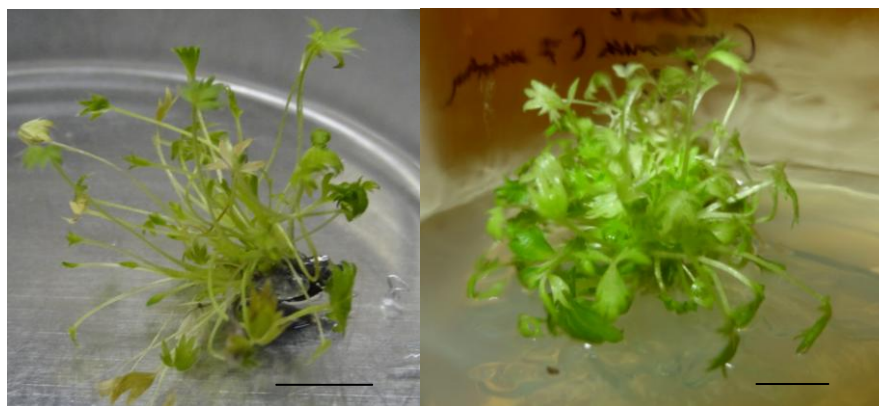


Рис. 24 Множественное побегообразование *in vitro* у разных сортов миниатюрной розы: а) Беби Бантинг, б) Мандарин, в) Рулети, г) Бигуди, д) Синдерелла, е) Цвѣркѳениг
 Fig. 24 *In vitro* multiple microshoots regeneration of mini roses cvs. Baby Bunting (a), Mandarin (b), Ruletti (c), Bigudi (d), Cinderella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

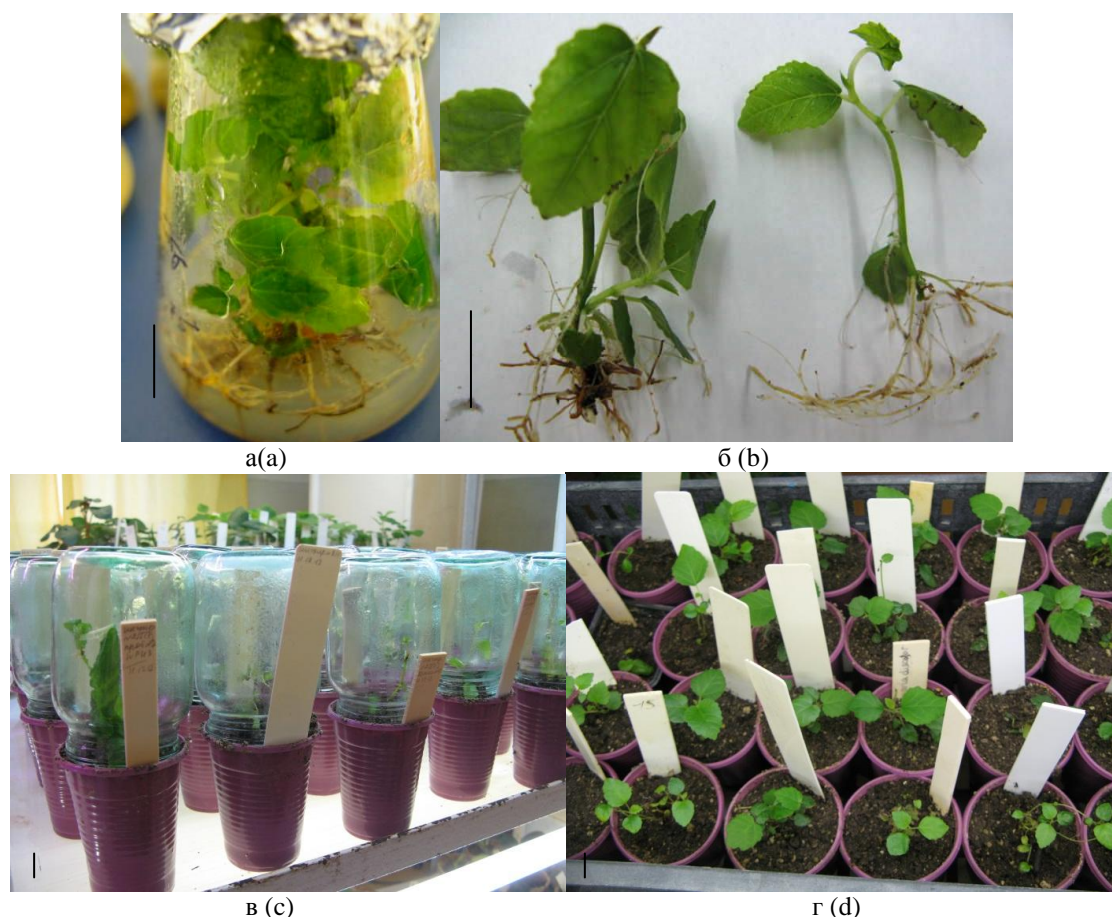


Рис. 26 Укорененные растения (а, б) и регенеранты инжира на адаптации *in vivo* (в, г). Масштаб 1 см
 Fig. 26 Rooted plantlets (a, b) and regenerants of fig at *in vivo* adaptation (c, d). Bar 1 cm

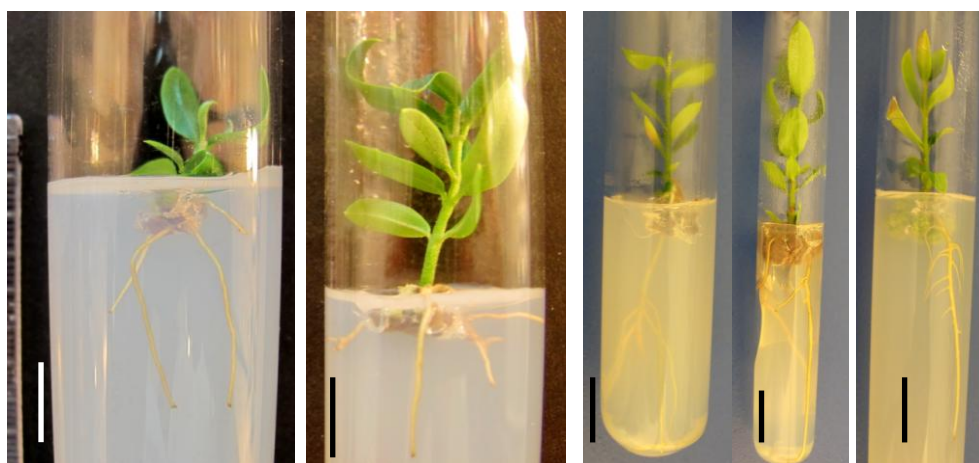


Рис. 27. Укоренённые *in vitro* микропобеги 1000-летней маслины европейской спустя 96-120 сут с момента последнего субкультивирования на среде $\frac{1}{2}$ WPM (масштаб 1 см)
 Fig. 27 *In vitro* rooted microshoots of 1000 years olive after 96-120 days the last subculture on medium $\frac{1}{2}$ WPM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

сортов как Multi Blue (рис. 28 а) и Madam le Coultre (рис. 28 б, в, г). По пути индуцированного ризогенеза образовывались корни у сортов клематиса Алёша, Юность, Алёнушка, Nelly Moser, Ville de Lyon Madam le Coultre, Mrs Cholmondeley и других.

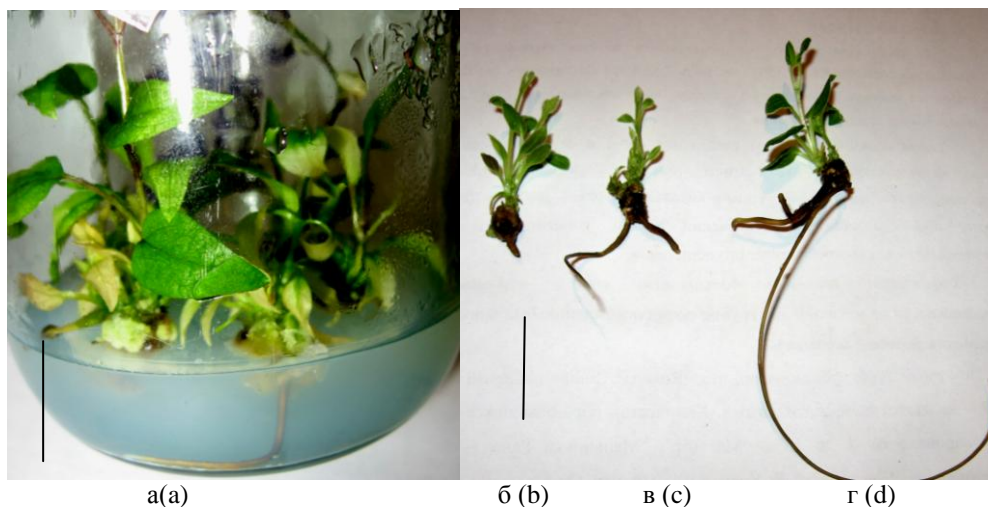


Рис. 28 Корнеобразование *in vitro* микропобегов клематиса сортов Multi Blue (а) и Madam le Coultre после 14 (б), 32 (в) и 65 (г) сут культивирования (масштаб 1 см)

Fig. 28 *In vitro* rhizogenesis of microshoots of Clematis cv. Multi Blue (a) and cv. Madam le Coultre after 14 (b), 32 (c) and 65 (d) days of culture (Bar 1 cm)

Характерной особенностью канны садовой является ее способность к спонтанному корнеобразованию. Так у сорта канны садовой Суевия в процессе длительного культивирования микропобега на питательной среде МС, дополненной 2,0 – 4,0 мг/л БАП и 1,0 мг/л ГК₃ образуется до 4 корней на эксплант. Средняя длина корней регенерантов на 94-е сут культивирования в асептических условиях увеличивается до 1,17 см. На 145 сутки культивирования в условиях *in vitro* их длина достигает 3,7 см. Активный ризогенез микропобегов (до 7 корней на эксплант, длиной от 2 до 8 см) у сортов канны садовой Суевия, Президент и Дар Востока возможно получить на 60 сутки, помещая их на питательную среду МС, дополненную 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК и на среду Pierik, содержащую 0,5 мг/л кинетина и 1,0 мг/л НУК. На рисунке 29 представлены полноценные регенеранты канны сортов Президент и Суевия.

Экспланты сортов миниатюрной розы Беби Бантинг, Цверкениг и Бигуди при индукции образования корней на различных вариантах питательной среды ½МС с 1,5 мг/л НУК, 1,0 мг/л НУК, 1,0 мг/л ИУК и без добавления регуляторов через четыре недели культивирования формируют корни (рис. 30). Через 8 недель культивирования корни образуются у сорта Рулети. В среднем этот показатель у всех исследуемых сортов составляет 6 недель. Кроме того, в марте после 3-4 месяцев культивирования отмечено спонтанное образование корней у сорта Цверкениг. В этот период рост корней происходит и на среде ½МС без регуляторов роста.

При длительном культивировании (более 30 – 35 суток) на среде ½ МС, без регуляторов роста или дополненной 0,1 – 0,2 мг/л кинетина, у 5 – 7% микророзеток *P. recta* отмечали спонтанный ризогенез. На питательной среде ½ МС, дополненной низкими концентрациями кинетина (0,1 – 0,2 мг/л) развиваются светлые корни, густо покрытые корневыми волосками, тогда как на корнях, образующихся на питательной среде без регуляторов роста, корневые волоски отсутствуют, либо формируются в незначительном количестве (рис. 31).

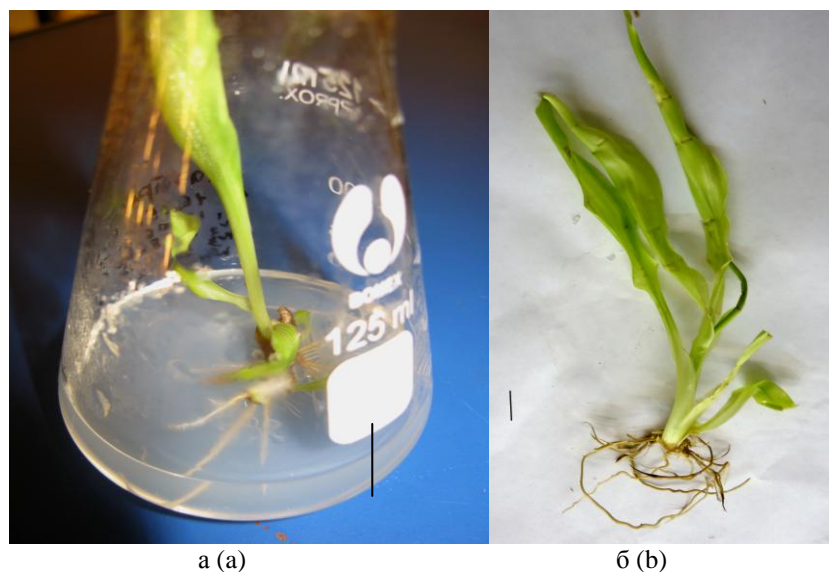


Рис. 29 Укорененные в условиях *in vitro* микропобеги сортов канны Президент (а) и Сувевия (б). Масштаб 1 см

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

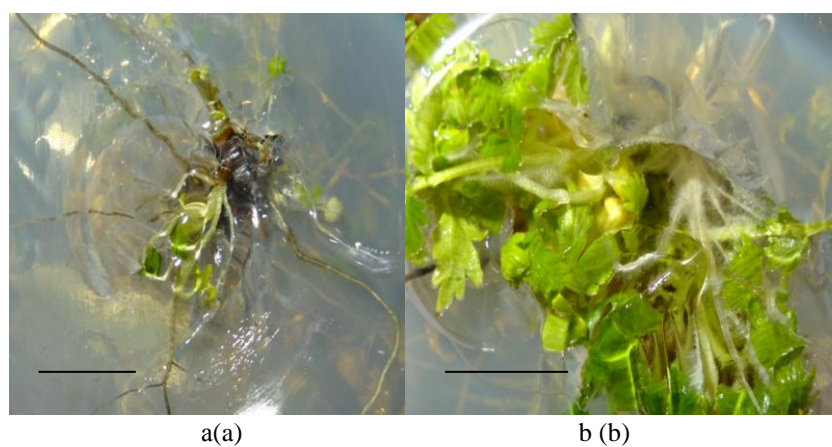


Рис. 31 Корнеобразование *in vitro* у *P. recta* на питательной среде МС без регуляторов роста (а) и МС, дополненной 0,1 – 0,2 мг/л кинетина (б). Масштаб 1 см

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⁻¹ 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 высеочки 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.

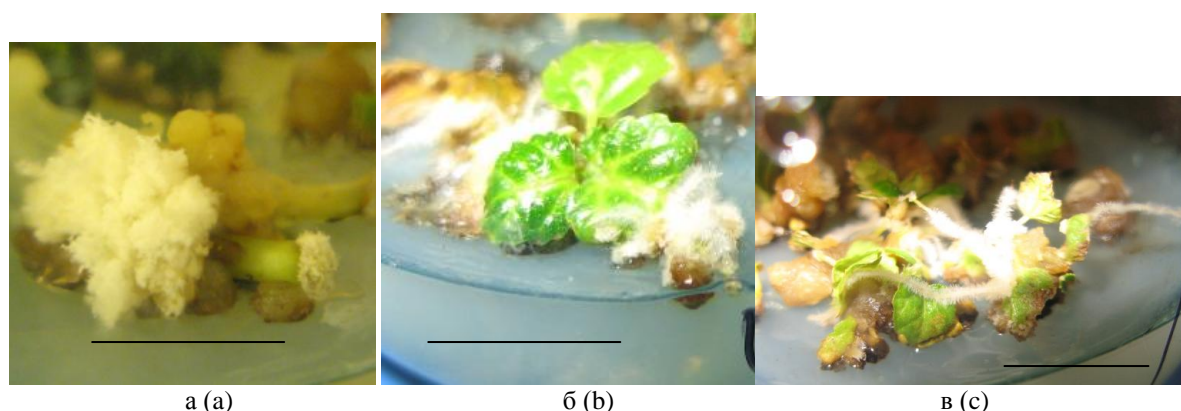


Рис. 32 Образование эмбрионного каллуса на сегменте микропобега (а) и развитие проростков (б, в) из соматических зародышей инжира сорта Сабруция Розовая (масштаб 1 см)
Fig. 32 Embryogenic callus formation on part of microshoot (a) and seedlings development (b, c) from somatic embryos of fig cv. Sabrucia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

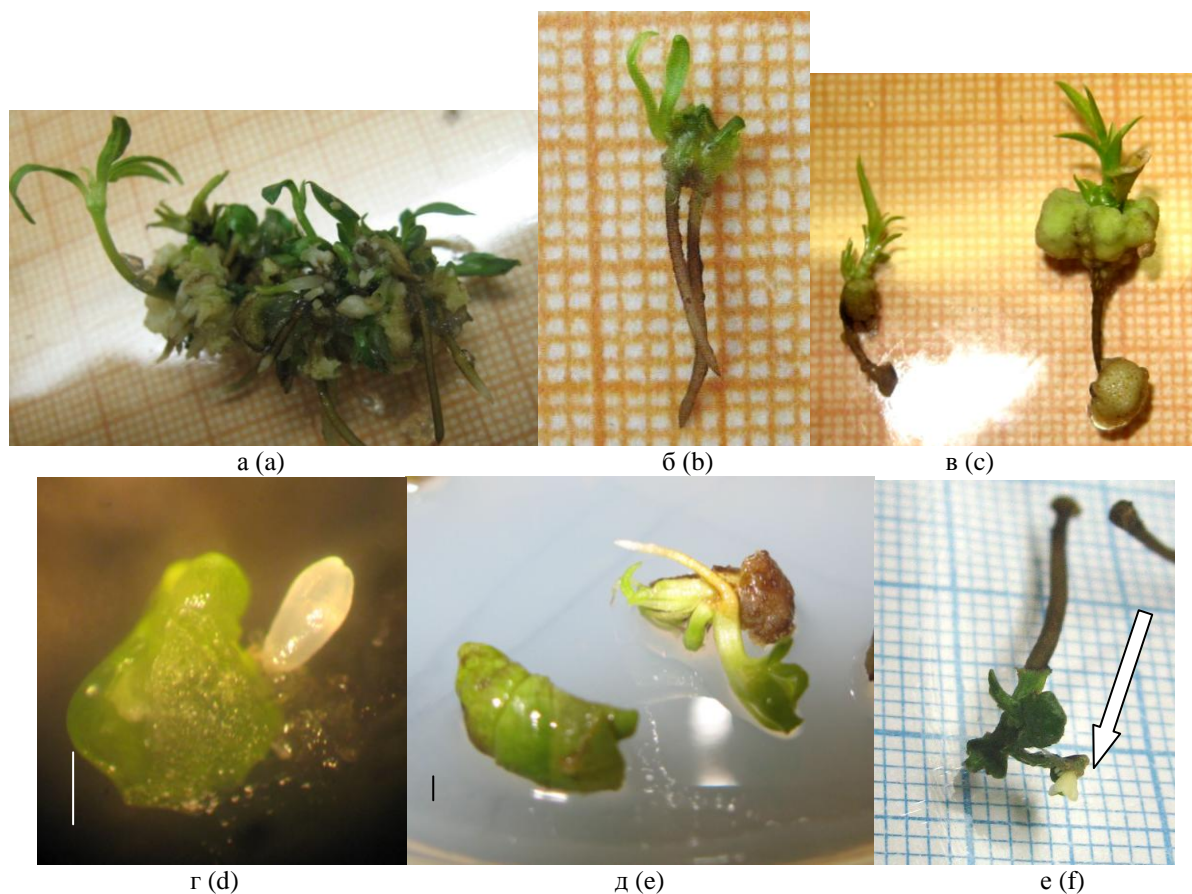


Рис. 33 Соматический эмбриогенез *in vitro* в культуре сегментов микропобега и высечек листа клематиса: а) конгломерат соматических зародышей и проростков сорта Аленушка; б) развившиеся проростки из соматических эмбриондов сорта Аленушка; в) сформировавшиеся глобулярные структуры на проростках сорта 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.

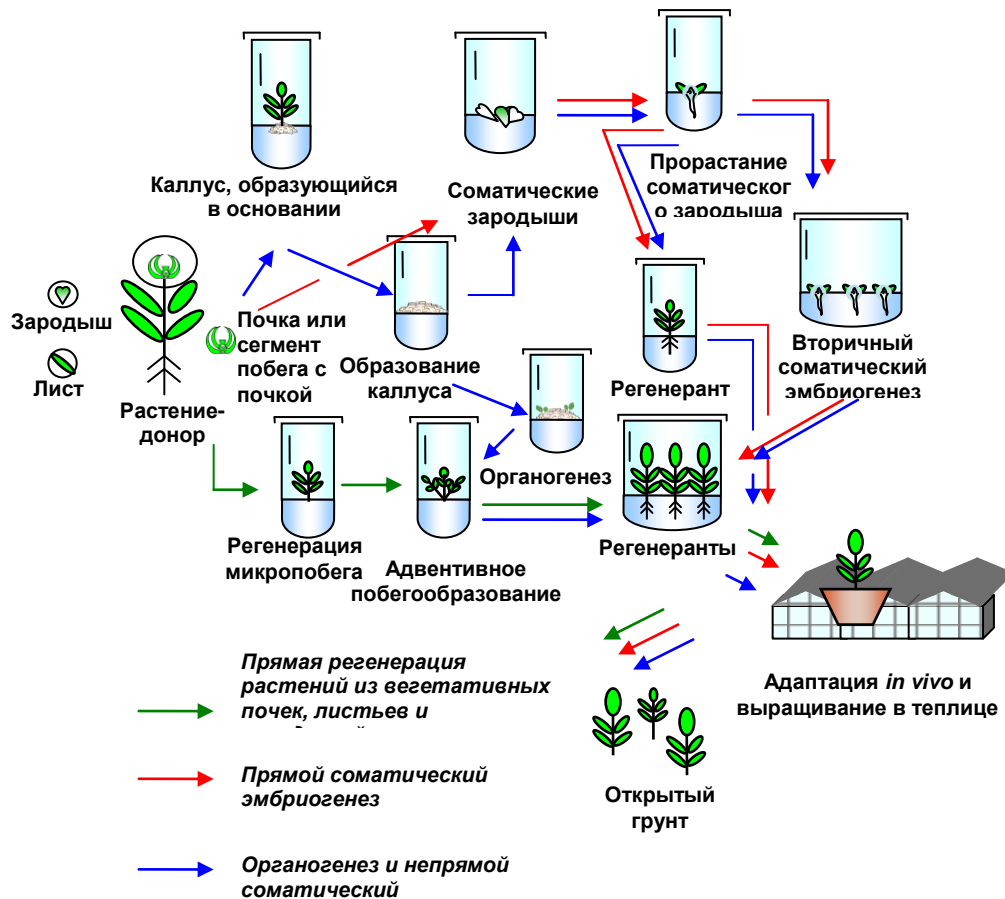


Рис. 34 Биотехнологическая схема размножения и получения растений представителей семейств Ranunculaceae, Cannaceae, Moraceae, Rosaceae, Myrtaceae, Oleaceae, Actinidiaceae через органогенез и соматический эмбриогенез *in vitro*

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 И.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.*