

Авторы:
Малаева Елена Викторовна
Коротков Олег Игоревич
Сафронова Галина Николаевна
Жолобова Ольга Олеговна
Буганова Анастасия Викторовна

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ РЕДКИХ И ЦЕННЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ

Учебно - методическое пособие

Ответственный за выпуск
Компьютерный набор и вёрстка *Е.В. Малаевой*

«ПЛАНЕТА»
Тел./факс: (8442) 49-23-69
E-mail: uchbook@mail.ru
Сайт: www.planeta-kniga.ru

Подписано в печать 21.06.2016. Формат 60x86 1/16
Печать офсетная. Бумага офсетная. Гарнитура «Times New Roman».
Физ. печ. л. 2,75. Заказ 483п.

ООО «Печатные решения»
400005, г. Волгоград, ул. им. Глазкова, д. 23, секция 2/1.

Министерство природных ресурсов и экологии
Волгоградской области
Государственное бюджетное учреждение Волгоградской области
Волгоградский региональный ботанический сад

**Малаева Е.В., Коротков О.И., Сафронова Г.Н.,
Жолобова О.О., Буганова А.В.**

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ РЕДКИХ И ЦЕННЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ

Учебно - методическое пособие

Москва
«Планета»

УДК 582 (075); 582./5.(07)
ББК 41
К504

А в т о р ы :
Малаева Е.В., Коротков О.И.,
Сафронова Г.Н., Жолобова О.О., Буганова А.В.

Р е ц е н з е н т :
О.И. Молканова, к.с.-х.н, ФГБУН Главный ботанический сад
им. Н.В. Цицина РАН (ГБС РАН)

Одобрено к печати на заседании Ученого совета ГБУ ВО «ВРБС»
(протокол № 4/13)

К504 Клональное микроразмножение редких и ценных видов растений. Учебно-методическое пособие / авторы сост.: Е.В. Малаева, О.И. Коротков, Г.Н. Сафронова и [др.]. – М.: Планета, 2016. – 44 с.

ISBN 978-5-91658-964-1

В пособии приводятся краткие сведения о приемах работы с культурой изолированных органов и тканей растений, этапах проведения работ по клональному микроразмножению растений. Представлены сведения по результатам восьмилетней работы с редкими и ценными видами растений.

УДК 582 (075); 582./5.(07)
ББК 41

© Коллектив авторов, 2016
© ООО «Печатные решения», 2016
ISBN 978-5-91658-964-1 © Оформление, ООО «Планета», 2016

Мезоинозит	100	-	-	200	-	-
Аскорбиновая кислота	-	-	-	3	-	-
Тиамин-НСl	0,5	-	-	3	-	-
Пиридоксин-НСl	0,5	-	-	1	-	-
Никотиновая кислота	0,5	-	-	-	-	-
Сахароза	30000	20000	2000	60000	20000	20000
Агар, агароза	-	-	-	7000	7000	7000

*приводится только минерально-сахарозный состав (Бутенко, 1971).

Приложение 1.

Компоненты сред	Концентрация (мг/л) в средах по прописи					
	Мурасиге -Скуга (1962)	Гамбург , Эвелег (1968)	Уайт (1939)	Нич и Нич (1974 - 1975)	Уайт для безводных солей*	Эллер *
KNO ₃	1900	3000	81	950	80	-
KCl	-	-	65	-	65	750
NaNO ₃	-	-	-	-	-	600
NH ₄ NO ₃	1650	-	-	720	-	-
Ca(NO ₃) ₂	-	-	142	-	200	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134	-	-	-	-
MgSO ₄	-	-	-	-	360	-
MgSO ₄ x7H ₂ O	370	500	74	185	-	250
CaCl ₂ xH ₂ O	-	-	-	166	-	-
CaCl ₂ x2H ₂ O	440	150	-	-	-	75
KH ₂ PO ₄	170	-	12	68	-	-
Na ₂ SO ₄	-	-	-	-	200	-
NaH ₂ PO ₄	-	-	-	-	16,5	-
NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O	-	150	-	-	-	125
MnSO ₄	-	-	-	-	4,5	-
MnSO ₄ x4H ₂ O	22,3	-	-	25	-	0,1
MnSO ₄ xH ₂ O	-	10	-	-	-	-
ZnSO ₄	-	-	-	-	1,5	-
ZnSO ₄ x4H ₂ O	8,6	-	-	-	-	1
ZnSO ₄ x7H ₂ O	-	2	-	10	-	-
H ₃ BO ₃	6,2	3	-	10	1,5	1
CuSO ₄ x5H ₂ O	0,025	0,075	-	0,025	-	0,3
Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	0,25	0,25	-	0,25	-	-
CoCl ₂ x6H ₂ O	0,025	-	-	-	-	-
AlCl ₃	-	-	-	-	-	0,03
NiCl ₂ x6H ₂ O	-	-	-	-	-	0,03
FeCl ₃ x6H ₂ O	-	-	-	-	-	1
FeSO ₄ x7H ₂ O	27,8	27,8	27,8	-	-	-
Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	-	-	-	2,5	-
KJ	0,83	-	-	-	0,75	0,01
NaЭДТАx2H ₂ O	37,3	37,3	37,3	-	-	-
Секвестрен 330-Fe	-	28	-	25	-	-

Содержание

Введение.	4
I. Приемы работы с культурой изолированных органов и тканей растений	6
1. Стерилизация посуды, инструментов и материалов	6
2. Приготовление питательных сред	8
II. Особенности культивирования <i>in vitro</i> редких видов растений	18
1. Введение в культуру <i>in vitro</i>	18
2. Культивирование редких видов на этапе микроразмножения	21
3. Продолжительность пассажа	25
4. Укоренение и адаптация микропобегов редких видов растений	26
III. Особенности клонального микроразмножения плодово-ягодных культур	28
1. Введение в культуру <i>in vitro</i>	28
2. Состав питательных сред и условия культивирования на этапе микроразмножения	30
3. Продолжительность пассажа	36
4. Укоренение микропобегов	36
5. Адаптация растений-регенерантов к условиям <i>in vivo</i>	38
Литература	39
Приложение 1.	42

Введение

Клонирование наиболее редких и ценных в хозяйственном отношении дикорастущих видов, создание генетических банков на основе пересадочных культур и криобанков, получение биомассы, как источника ценных биологически активных веществ – все это различные направления биотехнологии, позволяющие сохранить генофонд растительных ресурсов (Калинин, 1992; Теплицкая, 2008).

В течение нескольких десятилетий, начиная с 1965 года, биотехнологические подходы микроразмножения в условиях *in vitro* разрабатывались для многих культурных видов растений, что позволило создать экспериментальную и теоретическую основу для работы с дикорастущими видами. Работы по использованию биотехнологических методов для сохранения биологического разнообразия проводятся в ряде стран мира (США, Япония, Израиль, Индия, Австралия), а также в России.

Банки *in vitro* редких и ценных видов растений созданы во многих научных и образовательных учреждениях: Главный ботанический сад им Н.В. Цицина РАН, Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Ботанический институт им. В.Л. Комарова РАН, Волгоградский региональный ботанический сад, Ботанический сад-институт Уфимского научного центра РАН, Ботанический сад имени проф. А.Г. Генкеля Пермского государственного университета, Удмуртский государственный университет и др. (Молканова, 2010).

Использование системы *in vitro* имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционными методами поддержания коллекций растений. Среди них – экономия площадей и затрат труда, независимость от климатических условий, возможность использования минимального количества эксплантов для получения стерильных культур без нарушения природных популяций, репродукция материала, трудно размножаемого традиционными методами и возможность его длительного хранения в асептических условиях (Молканова, 2008).

По своей сути микроклональное размножение аналогично вегетативному пути размножения растений с той лишь разницей, что оно протекает в пробирке в условиях *in vitro*, где из клеток изолированных тканей в итоге можно получить достаточно большое количество новых растений. Обязательным условием микроклонального размножения является идентичность полученного растительного материала исходному материнскому растению. Еще недавно этот способ рассматривали как возможность ускоренного размножения, а также как вспомогательный метод освобождения растений от вирусов. Однако результаты некоторых

растений : сб. науч. тр. III Междунар. науч. конф., Минск, 14–16 мая 2008 г. – Минск, 2008. – С. 300–304.

27. Молканова О. И. Генетические банки растений в ботанических садах России / О. И. Молканова // Сб. науч. тр. Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131 : Материалы международной конференции «Актуальные проблемы прикладной генетики, селекции и биотехнологии растений». – С. 22–27.

28. Орлов П.А. Клеточные и генно-инженерные технологии модификации растений. Минск. Топник, 2006. – 284с.

29. Разработка принципов сохранения и воспроизводства генетических фиторесурсов / Ю. К. Виноградова, Ю. Н. Горбунов, А. И. Макридин [и др.] // Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами. – М., 2005. – С. 343–350.

30. Сафронова Г.Н., Попов А.В., Кулаков В.П., Гребенников К.А. Комплексное изучение *Iris tenuifolia* Pall. на территории Волгоградской области. // Материалы II Московского международного симпозиума по роду Ирис «Iris-2011». Москва, 2011. С. 115-120.

31. Теплицкая Л. М. Создание семенной коллекции *in vitro* видов орхидных крымской флоры / Л. М. Теплицкая, А. М. Бугара, Н. А. Астапенко // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология : тезисы IX Междунар. конф., Звенигород, 8–12 сентября 2008 г. – М., 2008. – С. 388–389.

32. Тихомирова Л.И. Особенности индукции морфогенеза из различных фрагментов цветка ириса в культуре *in vitro* // *Turczaninowia*. 2010. – № 3 (3). – С. 147-151.

33. Тихомирова Л.И. Особенности морфогенеза *Iris sibirica* L. в культуре *in vitro*. // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии. Материалы восьмой международной научно-практической конференции – Барнаул, 2009. – С. 364-369.

34. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures// *Physiol. Plant.* - 1962. - V.15, №13. - P.473-497.

13. Ишмуратова М. М. Использование культуры *in vitro* для размножения гибридов *Iris L.* / М. М. Ишмуратова, А. Ф. Рахимова // Раст. ресурсы. – 1999. – Т. 35, вып. 4. – С. 74–78.

14. Ишмуратова М. М. Особенности морфогенеза *Polemonium caeruleum L. in vitro* и *in vivo* / М. М. Ишмуратова, А. А. Зарипова // Раст. ресурсы. – 2000. – Т. 36, вып. 3. – С. 106–115.

15. Ишмуратова М. М. Семена травянистых растений: особенности латентного периода, использование в интродукции и размножении *in vitro* / М. М. Ишмуратова, К. Г. Ткаченко. – Уфа : Гилем, 2009. – 116 с.

16. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. – Киев, 1980. – 272 с.

17. Калинин Ф. Л., Кушнир Г. П., Сарнацкая В. В. Технология микрклонального размножения растений. – Киев: Наукова думка, 1992. – 488 с.

18. Малаева Е.В. Биологические и молекулярно-генетические особенности Дальневосточных вигов рода *Actinidia Lindl.*: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Е. В. Малаева. – М., 2008. – 20 с.

19. Мамаева Н.А. Сравнительный анализ морфологических биологических признаков сортов содовых бородатых ирисов (секция *Iris* рода *Iris L.*): дис. ... канд. биол. наук / Мамаева Н.А. – М., 2008. – 152 с.

20. Муратова С.А., Шорников Д.Г., Янковская М.Б. Размножение садовых культур *in vitro* (методические рекомендации / Муратова С.А., Шорников Д.Г., Янковская М.Б. – Мичуринск-научград, 2008. – 69 с.

21. Катаева Н. В. Клональное микроразмножение растений / Н. В. Катаева, Р. Г. Бутенко. – М. : Наука, 1983. – 236 с.

22. Коротков О. И. Формирование и комплексное изучение коллекции клематисов (род *Clematis L.*): биотехнологические и молекулярно-генетические аспекты : автореф. дис. ... канд. биол. наук / Коротков О. И. – М., 2008. – 24 с.

23. Куклина А.Г. Семерикова Е. А., Молканова О.И. Опыт клонального микроразмножения голубых жимолостей // Бюл. Гл. ботан. сада. Вып. 185. 2003. - С. 160-167.

24. Кунах В.А. Генетическая изменчивость соматических клеток растений. 3. Каллусообразование *in vitro* // Биополимеры и клетка. – 1997. - № 5. – Вып. 13. – с. 362.

25. Лутова Л.А. Биотехнология высших растений/Л.А. Лутова.-СПб.: изд-во СПбГУ, 2003. - 228с.

26. Молканова О. И. Особенности клонального микроразмножения у различных таксономических групп растений / О. И. Молканова // Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии

исследований показали, что значение этого метода существенно возрастает для клоновой селекции растений (экспериментальный мутагенез и расхимеривание), криосохранение ценного исходного материала. Способность к образованию больших количеств соматических зародышей в условиях *in vitro* используется для разработки технологии массового и непрерывного получения «искусственных семян». Более того, метод клонального микроразмножения может быть с успехом использован для создания синтетических сортов. (Атанасов, 1993).

Данное методическое пособие предназначено для научных работников, изучающих вопросы размножения высших растений *in vitro*, физиологов растений, преподавателей и студентов высших учебных заведений, специализирующихся в области ботаники, физиологии растений и биотехнологии, а также широкого круга биологов.

I. Приемы работы с культурой изолированных органов и тканей растений

1. Стерилизация посуды, инструментов и материалов. Правила асептики

Одним из основных условий успешного культивирования изолированных культур является соблюдение строгой стерильности, поскольку на искусственных питательных средах хорошо развиваются микроорганизмы, что представляет собой двойную опасность. Во-первых, в результате жизнедеятельности микроорганизмов может существенно измениться состав питательных сред. Во-вторых, изолированные от растения ткани, клетки и, в особенности, протопласты легко повреждаются микроорганизмами. Поэтому все опыты проводят в стерильных помещениях – боксах или ламинар-боксах и с использованием стерильных материалов и инструментов.

Стерилизация может быть достигнута следующими методами:

- влажным (текущим) жаром (автоклавирование, кипячение, пастеризация, дробная стерилизация – тиндализация);
- сухим жаром (нагревание горячим воздухом в сухожаровых шкафах, обжигание);
- с помощью различных химических веществ (стерилизующих агентов);
- фильтрованием через бактериальные фильтры;
- облучением ультрафиолетовыми лучами.

Стерилизация посуды

Вся посуда перед стерилизацией должна быть тщательно вымыта и высушена. Культуральные сосуды (колбы, пробирки, банки, чашки Петри и т.п.) перед заполнением их питательными средами стерилизуют завернутыми в плотную бумагу сухим жаром в сухожаровом шкафу, размещая на металлических полках. Продолжительность стерилизации при 150°C – 2,5ч., при 160°C – 2 часа. За это время погибают не только бактерии, но и их споры. Автоклавируют под давлением 2 атм. (133°C) в течение 25-30 мин.

Стерилизация инструментов

Предварительная стерилизация инструментов (скальпелей, пинцетов, игл и др.) производится прокаливанием сухим жаром в сушильном шкафу в течение 2 ч при температуре 160°C. Шприцы, ножницы, пробочные сверла удобнее кипятить. Непосредственно перед работой и в процессе работы инструменты еще раз стерилизуют в ламинар-боксе, помещая их в фарфоровый стакан с 96%-ным этиловым

Литература

1. Атанасов А.И. Биотехнология в растениеводстве/А.И. Атанасов.- Новосибирск: изд-во ИЦиГ СО РАН, 1993. – 241 с.
2. Батыгина Т. Б. Размножение растений / Т. Б. Батыгина, В. Е. Васильева. – СПб. : Изд-во СПб. ун-та, 2002. – 230 с.
3. Белокурова В.Б., Листван Е.В., Майстров П.Д., Сикура Й.Й., Глеба Ю.Ю., Кучук Н.В. Использование методов биотехнологии растений для сохранения и изучения биоразнообразия мировой флоры // Цитология и генетика. – 2005. – № 1. – с. 41-51.
4. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе / Р. Г. Бутенко. – М. : ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
5. Бутенко Р. Г. Культура клеток растений и биотехнология. – М.: Наука, 1986.- 280 с.
6. Ветчинкина Е. М. Биологические особенности культивирования *in vitro* семян и зародышей редких видов растений : автореф. дис. ... канд. биол. наук / Е. М. Ветчинкина. – М., 2010. – 20 с.
7. Вечернина Н. А. Сохранение биологического разнообразия редких, исчезающих видов, уникальных форм и сортов растений методами биотехнологии: автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Вечернина Н. А. – Барнаул, 2006. – 33 с.
8. Высоцкий В. А. Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного материала плодово-ягодных культур : автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Высоцкий В. А. – М., 1998. – 44 с.
9. Высоцкий В.А., Бартенева Л.В. Особенности клонального размножения актинидии// Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. М., 1991. С.213-216.
10. Генетические банки растений: проблемы формирования, сохранения и использования / О. И. Молканова, О. И. Коротков, Е. М. Ветчинкина [и др.] // Вестн. Удмуртского ун-та. – 2010. – Вып. 3. – С. 33–39.
11. Жолобова О.О. Сохранение редких и исчезающих видов растений в культуре *in vitro* и оценка уровня их внутривидового полиморфизма: автореф. дис. ... канд. биол. наук / О.О. Жолобова. – Белгород, 2012. – 23 с.
12. Здруйковская – Рихтер А.И. Культура изолированных зародышей и некоторые другие приемы выращивания растений *in vitro* / А.И. Здруйковская- Рихтер// Методические рекомендации. – М., 1974. 65 с.

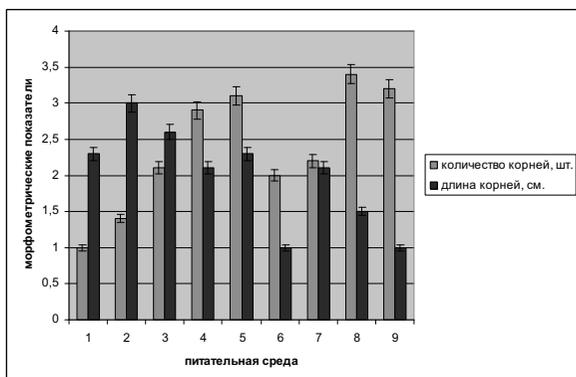


Рис. 13. Влияние ауксинов на морфометрические показатели микробегов жимолости

1- Б/Г; 2- ИУК 0,5 мг/л; 3- ИМК 0,5 мг/л; 4- ИУК 1,0 мг/л; 5- ИМК 1,0 мг/л; 6- ИУК 1,5 мг/л; 7- ИМК 1,5 мг/л; 8- ИУК 2,0 мг/л; 9- ИМК 2,0 мг/л

5. Адаптация растений-регенерантов к условиям *in vivo*

По нашему мнению, наиболее ответственным моментом при клональном микроразмножении является перевод растений из асептической культуры в нестерильные условия.

Для лучшей адаптации растений к условиям *in vivo* в первые две недели необходимо поддерживать относительную влажность 75-80%. Это можно обеспечить, создав условия «влажной камеры» с ежедневным кратковременным проветриванием. Температура должна быть не ниже 20°C и не выше 25°C, т. к. при снижении температуры наблюдается замедление темпов роста. Необходимо обеспечивать повышенную освещенность растений.

Через 2-3 месяца после адаптации растения можно переносить в открытый грунт.

По нашим данным, использование двухстадийной адаптации дает положительный эффект для плодово-ягодных культур. В качестве субстрата используется смесь торфа, песка и почвы в соотношении 1:1:1. Выход адаптированных растений составляет 70 – 95%.

спиртом, затем обжигая в пламени спиртовки. Стерильный инструмент используют только для одноразовой манипуляции. Перед повторным употреблением его снова следует простерилизовать спиртом и обжечь.

Стерилизация материалов

Вату, марлю, ватные пробки, бумажные матрасики, фильтровальную бумагу, халаты стерилизуют в автоклаве под давлением 2 атм. в течение 25-30 мин. Бумажные матрасики из плотной офисной бумаги можно стерилизовать в сушильном шкафу, однако со временем бумага темнеет и становится хрупкой.

Стерилизация ламинар-бокса и операционной комнаты.

Стерилизация операционной комнаты и ламинар-бокса является необходимой процедурой, в результате которой должны быть устранены источники возможной инфекции тканевых и клеточных культур (бактерии, споры, грибы).

Ламинар-боксы предназначены для выполнения работ, требующих стерильности, которая обеспечивается с помощью бактериальных воздушных фильтров. Внутренние поверхности ламинар-бокса перед работой протирают спиртом, за 10-20 минут до начала работы включают ультрафиолетовую бактерицидную лампу.

Перед работой в ламинар-боксе следует плотно закрыть дверь в асептическую комнату, одеть чистый халат, шапочку, маску, бахилы. Протереть руки спиртом. В процессе работы недопустимо открывать двери в операционную комнату. Недопустимо прерывать выполнение операции, вынимая руки из ламинар-бокса.

Стерилизация воды и питательных сред

Существуют два основных способа стерилизации питательных сред – автоклавирование и фильтрование. В первом случае разлитые в колбы или пробирки питательные среды и дистиллированную воду закрывают ватными пробками и фольгой и автоклавируют при температуре 120°C и давлении 1 атм. в течение 20 минут. Можно сначала методом автоклавирования простерилизовать большое количество среды в одном объеме, а затем в ламинарном боксе разлить ее в стерильную посуду для культивирования.

Время термической обработки зависит от объема посуды, в которую разлита среда. Например пробирки со средой стерилизуют 15 минут при температуре 115°C, а колбы содержащие 500 мл среды дезинфицируют 30 минут при температуре 121°C и 45 минут при 115°C.

Во втором случае используют стерильные фильтры Зейтца, Беркефельда, мембранные фильтры, незаменимые для приготовления сред с термолабильными компонентами (некоторые стимуляторы роста, витамины, антибиотики, аминокислоты, растительные экстракты),

которые разрушаются при автоклавировании. Фильтрация сред (холодная стерилизация) применяется также для приготовления смесей ферментов и выделения изолированных протопластов, сред с биологически активными компонентами.

Стерилизация растительного материала

Для поверхностной стерилизации растительных тканей применяют большой набор химических веществ. Наиболее часто используют соединения, содержащие активный хлор (гипохлорит натрия, хлорную известь, гипохлорит кальция, хлорамин), двуххлористую ртуть (сулему), перекись водорода, этиловый спирт, синтетические комплексные стерилизаторы (лизоформин, тетрамин и др.). Реже используют бром, серную кислоту и в особых случаях пользуются антибиотиками.

2. Приготовление питательных сред

Важным фактором, влияющим на успешность размножения того или иного вида растений, является питательная среда, которая должна содержать сбалансированный состав макро- и микроэлементов, углеводов, витаминов, регуляторов роста, аминокислот.

На сегодняшний день разработано большое количество стандартных прописей питательных сред для выращивания растений в асептической культуре. Наиболее известной является среда **Мурасиге-Скуга (МС, MS)**, разработанная в 1962г. Как показывает практика, композиция компонентов этой среды оказалась наиболее универсальной для культивирования представителей многих семейств травянистых растений.

Минеральные компоненты питательных сред

Макроэлементы:

К макроэлементам относят 6 основных химических элементов, которые растения получают из субстрата: они необходимы для любого растительного организма и входят в состав всех прописей и комплексных удобрений: азот, кальций, калий, фосфор, магний, сера. Углерод, водород и кислород растения получают из водной фазы культуральной среды и из воздуха.

Азот один из важнейших элементов, необходимых для нормального роста и развития растений. В культуральных средах основными источниками азота являются аммонийные (NH_4^+) и нитратные (NO_3^-) формы. Азот входит в состав аминокислот (белков), нуклеиновых кислот, пигментов (хлорофиллы), алкалоидов, гормонов и других органических соединений. Дефицит азота характеризуется

древесных плодовых культур часто используют минеральную основу питательной среды WPM (Lloyd, McCown, 1980).

В качестве индукторов ризогенеза используют следующие ауксины: β -индолилуксусная кислота (ИУК), β -индолилмасляная кислота (ИМК) и α -нафтилуксусная кислота (НУК). Побеги разных культур специфично реагируют на тип ауксина и его концентрацию. Чаще всего используют концентрацию ауксинов в пределах 0,5-5,0 мг/л.

Для укоренения актинидии в культуре *in vitro* лучшие показатели наблюдали с ИУК по сравнению с ИМК (рис. 12). При этом оптимальной оказалась концентрация 1,0 мг/л. Выход адаптированных растений составил 70 – 95%. При укоренении малины ремонтантного типа оптимальная концентрация ИУК в среде составила 5,0 мг/л.

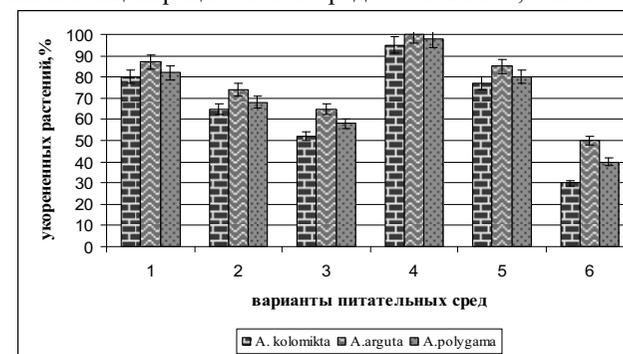


Рис.12. Влияние ауксинов на укоренение микропобегов различных видов актинидии

Условные обозначения: 1. - 1 мг/л ИМК 2. - 2 мг/л ИМК. 3. - 3 мг/л ИМК. 4. - 1 мг/л ИУК. 5. - 2 мг/л ИУК. 6. - 3 мг/л ИУК.

ИМК в концентрации 1 мг/л успешно применяли при укоренении жимолости (Куклина и др., 2003). В наших опытах эти данные получили экспериментальное подтверждение. Максимальные показатели количества корней и длины корней зафиксировали при использовании в качестве ауксина ИУК. Однако, наибольший процент укоренения (90%) наблюдается на средах с ИМК. При этом оптимальной оказалась концентрация ИМК 1,0 мг/л. Отмечено, что на данной питательной среде происходит лучшее развитие корневой системы у жимолости, особенно корней второго порядка (рис. 13).

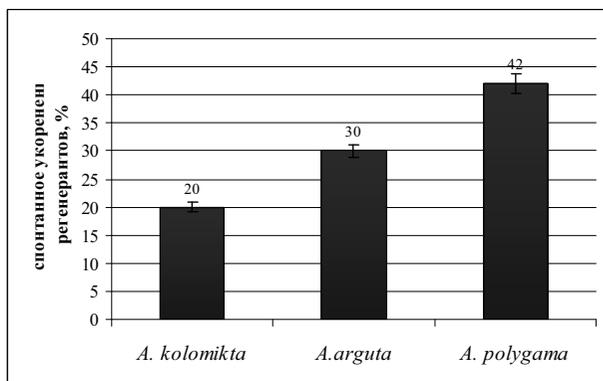


Рис. 11. Спонтанное укоренение различных видов актинидии на стадии собственно микроразмножения

Актинидия относится к растениям, которые могут образовывать корни на стадии микроразмножения. Однако для разработки промышленной технологии клонального микроразмножения видов и сортов актинидии данные показатели являются недостаточными.

3. Продолжительность пассажа

Продолжительность пассажей на разных этапах культивирования зависит от биологических особенностей культуры. Наблюдается следующая тенденция: чем выше коэффициент размножения и чем быстрее растут побеги, тем чаще их следует пересаживать. Длительный беспересадочный этап размножения побегов малины, жимолости приводит к некрозу и спонтанному укоренению. Для ежевики, малино-ежевичных гибридов, актинидии оптимальная продолжительность пассажа 2-2,5 месяца. Такая длина пассажа сочетает достаточно высокий коэффициент размножения и оптимальную длину побегов для укоренения.

4. Укоренение микропобегов

При укоренении регенератов для большинства культур используют питательные среды, содержащие пониженные концентрации солей, витаминов, сахарозы без регуляторов роста, либо содержащие небольшие количества ауксинов ИМК, НУК и ИУК в концентрации 1-5 мг/л (Катаева, Бутенко, 1983).

При укоренении многих плодово-ягодных культур используется половинная концентрация солей макроэлементов питательной среды на основе прописи Мурасиге Скуга (Murashige, Skoog, 1962). Для укоренения

хлоротичностью, угнетением роста и замедлением общих темпов развития растения в целом.

Фосфор поступает в корневую систему и функционирует в растении в виде окисленных соединений, главным образом остатков ортофосфорной кислоты ($H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}). Содержание фосфора в растениях составляет около 0,2% на сухую массу. Физиологическое значение фосфора определяется тем, что он входит в состав ряда органических соединений, таких, как нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК), нуклеотиды (АТФ, НАД, НАДФ), нуклеопротеиды, витамины и многих других, играющих центральную роль в обмене веществ. Фосфолипиды являются компонентами биологических мембран. Многие витамины и их производные, содержащие фосфор, являются коферментами и принимают непосредственное участие в каталитических реакциях, ускоряющих течение важнейших процессов обмена (фотосинтез, дыхание и др.). Недостаток фосфора влияет практически на все процессы жизнедеятельности растений. При фосфорном голодании на листьях, незрелых плодах появляются мертвые некротические пятна. Окраска листьев становится голубовато-зеленой или темно-зеленой, в некоторых случаях наблюдается накопление красного пигмента-антоциана.

Сера содержится в растениях в количестве 0,17%. Поступает сера в растения в виде сульфатона SO_4^{2-} . Сера входит в состав трех аминокислот-цистина, цистеина и метионина. Почти все белки включают аминокислоты, содержащие серу. Сера входит также в состав многих витаминов и многих коферментов, таких, как биотин, тиамин, коэнзим А, глутатион, липоевая кислота и др. Соединения серы участвуют в поддержании уровня окислительно-восстановительного потенциала клетки. Показано, что в молодых органах сера находится главным образом в восстановленной форме, а старых — в окисленной. Признаки серного голодания очень близки к тем, которые наблюдаются при недостатке азота. Листья желтеют, появляется антоциановая окраска. Однако, в отличие от азота, эти признаки появляются, прежде всего, на молодых листьях.

Кальций входит в состав растений в количестве 0,2%. В старых листьях его содержание доходит до 1%. Поступает в виде иона Ca^{2+} . Кальций, соединяясь с пектиновыми веществами, дает пектаты кальция, которые являются важнейшей составной частью клеточных оболочек растений. Присутствие кальция важно для нормального функционирования мембран: дефицит кальция приводит к увеличению проницаемости мембран, нарушению их целостности, а соответственно процессов мембранного транспорта. Кальций принимает участие в поддержании структуры хромосом, являясь связующим звеном между

ДНК и белком. Он необходим также для поддержания структуры митохондрий и рибосом, образования ламелл во вновь образующихся клетках. Кальций является активатором таких ферментов, как фосфорилаза, аденозинтрифосфатаза, дегидрогеназы, амилазы и др., реагирует с различными органическими кислотами, давая соли, и тем самым является в определенной мере регулятором значения pH клеточного сока. При недостатке кальция повреждаются и отмирают, в первую очередь, меристематические зоны стебля, корня и листьев. В свою очередь это тормозит процессы роста.

Калий поступает в растение в виде иона K^+ . Содержание калия в растении в среднем составляет 0,9%. Физиологическую роль калия нельзя считать полностью выясненной. Калий не входит ни в одно органическое соединение. Большая часть его (70%) в клетке находится в свободной ионной форме и легко извлекается холодной водой, остальные 30% в адсорбированном состоянии. В противоположность кальцию калий снижает вязкость протоплазмы, повышает ее оводненность, увеличивая гидратацию белков. Соли калия растворимы и участвуют в регуляции осмотического потенциала клетки. Калий активирует работу многих ферментных систем – гексокиназы, пируваткиназы, а также ферментов, участвующих в образовании АТФ в процессе окислительного фосфорилирования. Под влиянием калия увеличивается накопление крахмала, сахарозы, моносахаридов. При недостатке калия на листьях проявляются хлоротические (белые) пятна. Некротические участки, края и концы листьев часто скручиваются.

Магний поступает в растение в виде иона Mg^{2+} . Содержание магния в растениях составляет в среднем 0,17%. Магний входит в состав основного пигмента зеленых листьев — хлорофилла, поддерживает структуру рибосом, связывая РНК и белок. Поэтому синтез белка не идет при недостатке магния, а тем более в его отсутствие. Важной особенностью магния является то, что он связывает фермент с субстратом по типу хелатной связи (клевшевидная связь между органическим веществом и катионом). Магний активирует такие ферменты, как ДНК- и РНК-полимеразы, аденозинтрифосфатазу, глутаматсинтетазу; ферменты, катализирующие перенос карбоксильной группы,— реакции карбоксилирования и декарбоксилирования; ферменты гликолиза и цикла Кребса, молочнокислого и спиртового брожений. Поскольку магний входит в состав хлорофилла, то первым признаком голодания является интенсивное пожелтение паренхимы листа.

Железо входит в состав растения в количестве 0,08%. Необходимость железа была показана в тот же период, что и остальных макроэлементов. Поэтому, несмотря на ничтожное содержание, его роль

Все исследованные фитогормоны, за исключением кинетина, в целом обеспечивали увеличение коэффициента размножения видов актинидии.

Сравнительный анализ изучения влияния различных цитокининов показал, что под воздействием 2 iP коэффициент размножения *A. kolomikta* и *A. arguta* существенно превышал значение этого показателя на средах с 6-БАП.

Для *A. polygama* отмечено максимальное значение коэффициента размножения на средах, содержащих 6-БАП (0,5 мг/л) или Z (5,0 мг/л).

Содержание в среде зеатина увеличивало коэффициент размножения у всех исследуемых образцов актинидии, одновременно стимулируя образование каллуса, что в последствии незначительно затрудняло адаптацию растений - регенерантов *in vivo*.

Для представителей рода *Rubus* положительный эффект дает использование гибберелловой кислоты в концентрации 0,2-0,5 мг/л. Актинидия и жимолость не нуждаются в использовании экзогенной ГК. У жимолости гибберелловая кислота приводит к формированию конгломератов тонких побегов или побегов с видоизмененной морфологией, которые непригодны для укоренения.

Для получения побегов оптимальных для укоренения 1,5-2 см некоторые авторы рекомендуют снижать концентрацию 6-БАП в пассаже, предшествующем укоренению, до 0,01- 0,25 мг/л (Высоцкий, 1989; Муратова, Янковская, 2008), отмечая при этом снижение коэффициента размножения в очередных пассажах. По нашим данным, использование питательных сред без гормонов или питательной среды MS с половинным содержанием макросолей для актинидии и жимолости образует достаточное количество побегов пригодных для укоренения и нет необходимости в промежуточной фазе.

Кроме того, в процессе культивирования на стадии пролиферации у побегов разных видов актинидии наблюдали спонтанное укоренение. При этом частота укоренения зависела, в частности, от вида растения (рис. 11).

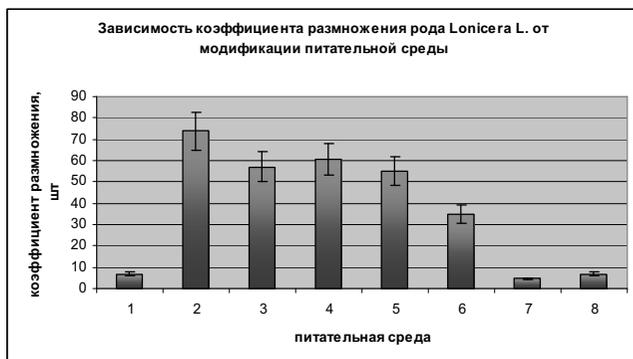


Рис. 9. Зависимость коэффициента размножения рода *Lonicera L.* от модификации питательной среды

1.-контроль; 2.-6-БАП 1,0+ИМК 0,5; 3.- 6-БАП 0,5+ИМК 0,5; 4.-6-БАП 0,5+ИМК 1,0; 5.- 6-БАП 0,5+ИУК 0,5; 6.- 6-БАП 0,5+ИУК 1,0; 7.-К 1,0+ ИМК 0,5; 8.- К 1,0+ ИУК 0,5.

Проведено изучение влияния типа и концентрации цитокининов в составе питательной среды на коэффициент размножения некоторых представителей рода *Actinidia* (рис. 10).

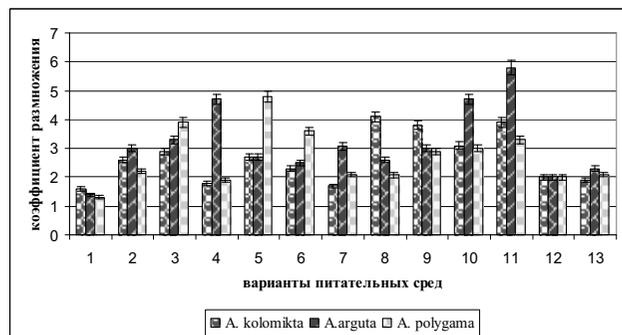


Рис.10. Влияние типа и концентрации цитокинина на коэффициент размножения некоторых представителей рода *Actinidia*.

Условные обозначения: 1. контроль, без гормонов. 2. Z 3,0 мг/л. 3. Z 5,0 мг/л 4. Zp5,0 мг/л. 5. 6-БАП 0,5 мг/л. 6. 6-БАП 1,0 мг/л. 7. 6-БАПp 1,0мг/л. 8. TDZ 0,02 мг/л. 9. TDZ 0,05 мг/л.10. 2iP 3,0 мг/л. 11. 2iP 5,0 мг/л. 12. K 0,5 мг/л. 13. K 1,0 мг/л.

рассматривается вместе с макроэлементами. Железо поступает в растение в виде Fe^{3+} , а транспортируется в листья по ксилеме в виде цитрата железа (III). Роль железа в большинстве случаев связана с его способностью переходить из окисленной формы (Fe^{3+}) в восстановленную (Fe^{2+}) и обратно. Железо входит в состав каталитических центров многих окислительно-восстановительных ферментов. В виде геминной группировки оно входит в состав таких ферментов, как цитохромы, цитохромоксидаза, нитратредуктаза, нитритредуктаза, леггемоглобин, каталаза и пероксидаза. Цитохромная система является необходимым компонентом дыхательной и фотосинтетической электронтранспортной цепи. Кроме того, целый ряд ферментов содержит железо в негемовой форме. К таким ферментам относятся некоторые флавопротеиды, нитрогеназа, железосодержащий белок ферредоксин, фитоферритин и др. Железо необходимо для образования хлорофилла. Недостаток железа вызывает интенсивный хлороз листьев, в первую очередь молодых. Характерным является то, что хлороз проявляется в пространстве между жилками, при этом желтая поверхность листьев покрыта сеткой зеленых жилок.

Микроэлементы:

К группе микроэлементов относят незаменимые химические элементы, которые необходимы растениям в количествах 0,01% и менее (в расчете на сухую массу). Роль большинства микроэлементов определена участием в активных центрах ферментов, поэтому их дефицит может негативно сказываться уже на самых ранних этапах онтогенеза.

Марганец поступает в растение в виде ионов Mn^{2+} . Среднее содержание марганца в растениях 0,001%. Марганец характеризуется высоким показателем окислительно-восстановительного потенциала. Он необходим для нормального протекания фотосинтеза, участвует в восстановлении CO_2 , играет роль в поддержании структуры хлоропластов, участвует в азотном обмене в восстановлении нитратов до аммиака. Марганец активирует более 35 ферментов, участвующих в реакциях окисления-восстановления, декарбоксилирования и гидролиза. При недостатке марганца на листьях появляются желтые и некротические пятна — точечный хлороз листьев. Особенно чувствительны к недостатку марганца хлоропласты. В них происходит разрушение хлорофилла и нарушение структуры крахмальных зерен.

Медь поступает в растение в виде иона Cu^{2+} или Cu^+ . Среднее содержание меди в растениях 0,0002%. Медь входит непосредственно в состав ряда ферментных систем, относящихся к группе оксидаз, таких, как полифенолоксидаза, аскорбатоксидаза, цитохромоксидаза. Большая часть меди (75% от всего содержания меди в листьях) концентрируется в

хлоропластах. В хлоропластах сосредоточен и медьсодержащий белок синего цвета — пластоцианин. Медь, подобно железу и марганцу, обладает способностью к обратимому окислению и восстановлению: $\text{Cu}^{2+} + e \rightleftharpoons \text{Cu}^+$. Именно поэтому пластоцианин участвует в переносе электронов от фотосистемы II к фотосистеме I. При дефиците меди снижается активность первой фотосистемы, белеют и отмирают кончики листьев. Затем хлорофилл разрушается по краям листовой пластинки. Листья теряют тургор.

Цинк поступает в растение в виде ионов Zn^{2+} . Среднее содержание цинка в растениях 0,002%. В растениях цинк не участвует в окислительно-восстановительных реакциях, поскольку не меняет степень окисления. Он входит в состав более 30 ферментов, в т. ч. фосфатазы, карбоангидразы, алкогольдегидрогеназа, РНК-полимераза и др. Цинк играет важную роль при образовании фитогормона ауксина. При дефиците цинка возрастает проницаемость мембран, что свидетельствует о роли этого элемента в структуре мембран, в поддержании их интеграции. Цинк влияет на белковый синтез, на активность РНКазы. Обнаружены белки, содержащие цинк и участвующие в репликации ДНК и транскрипции. Недостаток цинка приводит к уменьшению размеров листьев и к изменению их формы. Листорасположение принимает розеточную форму, междоузлия укорачиваются, на листьях проявляется хлороз.

Молибден поступает в растения в виде аниона MoO_4^{2-} . Содержание молибдена в растениях составляет 0,0005—0,002%. Молибден входит в состав более 20 ферментов, выполняя при этом не только каталитическую, но и структурную функцию. Молибден вместе с железом входит в состав активного центра ферментного комплекса нитрогеназы в виде Mo-Fe-белок и участвует в фиксации азота атмосферы различными микроорганизмами. При недостатке молибдена резко падает содержание аскорбиновой кислоты. При отсутствии молибдена наблюдаются нарушения в фосфорном обмене растений. Со способностью молибдена к комплексообразованию связано влияние этого элемента на стабилизацию структуры нуклеиновых кислот. При недостатке молибдена листья по краям приобретают серую, а затем коричневую окраску, теряют тургор, а затем ткани листа отмирают и остаются только жилки в виде хлыстиков.

Бор поступает в растение в виде аниона борной кислоты — BO_3^{3-} . Среднее содержание бора в растениях 0,0001%. Роль бора выяснена далеко не достаточно. Это связано с тем, что бор, в отличие от большинства других микроэлементов, не входит в состав ни одного фермента и не является активатором ферментов. Тем не менее, выявлено,

промышленном размножении растений *in vitro* допустимы суточные колебания (в течение дня – выше, ночью – нижеуказанных значений) (Катаева, Бутенко, 1983; Высоцкий, Бартенева, 1991).

Для получения и поддержания активно пролиферирующей культуры *in vitro* важным является правильный выбор цитокинина. Положительные результаты были получены при использовании для микрклонального размножения различных таксономических групп растений цитокинина 6-БАП (Высоцкий, 1998; Бутенко, 1999, Коротков, 2008). На этапах введения и микроразмножения использовали следующие регуляторы роста: 6-бензиламинопурин (6-БАП), 6-бензиламинопурин рибозид (6-БАПр), зеатин (Z), кинетин – 6-фурфуриламинопурин, кинетин рибозид (Kp), 2-изопентиниладенин (2-iP), тидиазурон (TDZ). При клональном микроразмножении жимолости оптимальным цитокином является 6-БАП (рис. 8).



Рис. 8. Зависимость коэффициента размножения рода *Lonicera* L. от типа цитокинина

По результатам наших опытов, очевидно, что коэффициент размножения жимолости на среде с 6-БАП является наилучшим—35. Использование цитокининов в сочетании с ауксинами является вполне обоснованным для этой культуры (рис.9). Наибольший коэффициент размножения наблюдали на среде 6-БАП 1,0+ИМК 0,5 - $74,0 \pm 10,1$ шт.

питательной среды Мурасиге Скуга формируются укороченные побеги с бледно – зелеными или желтоватыми листьями и коэффициент размножения в среднем составил $7,8 \pm 0,5$ (рис. 7).

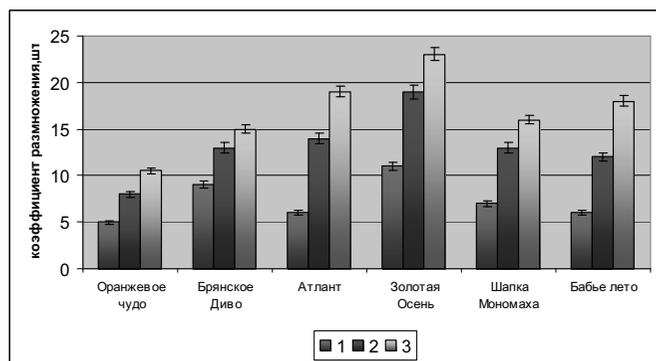


Рис. 7. Зависимость коэффициента размножения сортов ремонтантной малины от модификации питательной среды
1. – ½ Мурасиге Скуга + 0,5 мг/л 6-БАП; **2.** – Мурасиге Скуга + 0,5 мг/л 6-БАП; **3.** – Мурасиге Скуга + 2Fe + 0,5 мг/л 6-БАП.

Большему приросту побегов в длину представителей рода *Rubus* способствует замена в среде MS хлорида кальция на нитрат кальция или добавление гибберелловой кислоты в концентрации 0,2-0,5 мг/л.

Культивирование эксплантов происходит в закрытых культуральных сосудах, где влажность сохраняется постоянной (примерно на уровне 70%), поэтому важными факторами, оказывающими значительное влияние на процесс микроразмножения, являются условия освещенности и температура.

Для растений, культивируемых на питательной среде в качестве источников освещения обычно используют люминесцентные лампы с интенсивностью освещения 1000-5000 люкс (Бутенко, 1986; Высоцкий, 1998).

Изучение влияния реакции растений *in vitro* на длину дня позволило установить, что оптимальным периодом освещенности для большинства культур является 16 - часовой фотопериод; температура 20-25°C признана оптимальным температурным режимом для развития побегов у большинства таксонов (Murashige, Skoog, 1962). Однако при

что он принимает участие в метаболизме фенолов, углеводов, нуклеиновых кислот, ауксиновом обмене, в формировании структуры клеточных стенок, регуляции процессов роста и развития. Бор принимает участие в делении клеток и азотном обмене, регулирует процессы транспорта воды, углеводов и гормонов, усиливает рост пыльцевых трубок. При недостатке бора первый симптом — это отмирание точки роста, останавливается рост побегов и корней, листовые пластинки утолщаются, скручиваются, становятся ломкими, нарушается развитие сосудистой системы, клетки плохо дифференцируются.

Кобальт находится в тканях растений в ионной (Co^{2+} , Co^{3+}) и комплексной форме. Содержание кобальта в среднем составляет 0,00002%. Особенно кобальт необходим бобовым растениям, поскольку участвует в фиксации атмосферного азота. Кобальт входит в состав кобаламина (витамин B_{12} и его производные), который синтезируется бактериями в клубеньках бобовых растений. Показано влияние кобальта на функционирование фотосинтетического аппарата, синтез белка, его связь с ауксиновым обменом. Трудность решения вопроса о необходимости кобальта для всех растений заключается в том, что потребность в нем чрезвычайно мала.

Никель поступает в растения в виде иона Ni^{2+} , но может также находиться в виде Ni^{+} и Ni^{3+} . Роль никеля для высших растений как микроэлемента была доказана недавно. До этого считали никель необходимым микроэлементом многих бактерий. У высших растений никель входит в состав фермента уреазы, который осуществляет реакцию разложения мочевины. Никель активизирует ряд ферментов, в т. ч. нитратредуктазу и другие, оказывает стабилизирующее влияние на структуру рибосом.

Хлор поступает в растение в виде Cl. Хлор необходим для работы фотосистемы II на этапе фотосинтетического разложения воды и выделения кислорода. Показано влияние хлоридов на деление клетки. Концентрируясь в растении в вакуолях, хлориды могут выполнять осморегулирующую функцию. Недостаток хлора проявляется редко и наблюдается только на очень щелочных субстратах.

Иод добавляют к средам в виде иодида калия (KI). Входит в состав некоторых аминокислот. Необходим в незначительных количествах.

Органические соединения.

Углеводы:

К группе углеводов относят наиболее часто встречающиеся в тканях растений органические соединения – моно-, дисахариды, крахмал, целлюлоза и др. Углеводы – незаменимые компоненты питательных сред

для культивирования изолированных клеток и тканей, так как в большинстве случаев последние не способны к автотрофному питанию. Чаще всего в качестве источника углерода используют сахарозу или глюкозу в концентрациях 20-40 г на 1 л раствора. Сахароза – дисахарид, наиболее распространенный в растительных тканях, состоящий из 2 химически связанных моносахаров: β-фруктозы и α-глюкозы. Это основной энергетический материал растений, образующийся в процессе фотосинтеза. Известно, что изменяя ее концентрацию в питательной среде можно существенно влиять на характер морфогенеза, особенно при взаимодействии с регуляторами роста. Более того, наличие сахарозы (или других углеводов) в среде для укоренения необходимо, так как в случае ее отсутствия даже при наличии ауксинов процесс ризогенеза (образования корней) существенно замедляется или вообще прекращается.

Витамины:

Витамины – жизненно важные для нормального развития растений вещества. Это достаточно неоднородная группа органических соединений, наличие которых в питательной среде необходимо в малых количествах, однако отсутствие одного или нескольких витаминов может существенно сказаться на развитии растительного организма.

Витамины группы В необходимы для обмена веществ и роста растений, большинство из них входят в состав дрожжевого экстракта, который раньше обычно использовался в культуре тканей. Теперь многие из компонентов последнего идентифицированы и для более полного контроля над процессами роста и развития их рекомендуется вносить отдельно. К этой группе относят целый ряд соединений.

Тиамин (витамин В₁, C₁₂H₁₇ClN₄OS) рекомендован для большинства прописей сред, потому что функционирует в форме пирофосфата как кофермент цикла Кребса. В состав сред входит в виде хлоргидрата тиамина в концентрациях 0,1-10 мг/л.

Никотиновая кислота (витамин В₃, витамин РР, C₆H₅NO₂) – предшественник синтеза многих необходимых соединений в метаболизме растений. Одна из функций никотиновой кислоты проявляется в синтезе НАДФ и НАФ. Витамин РР добавляют к некоторым средам в концентрациях от 0,5 до 1 мг/л.

Пиридоксин (витамин В₆, C₈H₁₁NO₃) также служит коферментом некоторых реакций обмена веществ. Пиридоксин занимает важное место в метаболизме аминокислот, позитивно влияет на процессы прорастания семян и роста проростков. В состав сред обычно добавляется в форме хлоргидрата в количествах 0,5-1 мг/л.

L-аскорбиновая кислота (витамин С, C₆H₈O₆) – наиболее известное соединение из группы витаминов. Принимает участие в

Исходя из нашего опыта для большинства плодово – ягодных культур на этапе введения в культуру *in vitro* можно использовать универсальную питательную среду Мурасиге-Скуга с добавлением 0,5 -1 мг/л 6-БАП с добавлением 20-40 г/л сахарозы или глюкозы, 6-8 г/л агара.

Известно, что на регенерационную способность в культуре изолированных апексов, а так же на коэффициент размножения *in vitro* существенное влияние оказывают генетические особенности видов и сортов.

Так экспланты *Actinidia arguta* и *A. polygama* развивались более активно по сравнению с *A. kolomikta* (табл. 4), и это коррелирует с энергией роста этих видов в природных условиях.

Таблица 4

Морфометрические показатели регенерантов видов актинидии на стадии микроразмножения (среда MS с добавлением 0,5 мг/л 6-БАП)

Вид	Число побегов, шт	Длина побегов, см	Коэффициент размножения
<i>A. kolomikta</i>	1,8±0,9	3,1±1,3	3,1±0,7
<i>A. arguta</i>	2,4±1,1	4,2±1,1	4,6±0,3
<i>A. polygama</i>	3,2±1,3	5,1±1,4	5,7±0,4

Причем различия в реализации морфогенетического потенциала между выше указанными видами существовали как на стадиях инициации, так и пролиферации.

Таким образом, на коэффициент размножения актинидии *in vitro* существенное влияние оказывают как видовые, так и сортовые особенности. Это соответствует данным исследователей, полученным на других культурах (Бутенко, 1986, Высоцкий, 1998).

Для малины и малино-ежевичных гибридов положительный эффект, выраженный в увеличении коэффициента размножения и лучшем развитии микропобегов наблюдали при увеличении содержания хелата железа в среде. При этом формируются хорошо развитые побеги с крупными листьями темно-зеленого цвета, тогда как при использовании ½

6. хлорамин 5%, 10 мин. 7. лизоформин 5%, 1 мин. 8. лизоформин 5%, 3 мин. 9. лизоформин 5%, 5 мин.

Для получения стерильной культуры плодовых растений, в частности актинидии, малины, жимолости мы использовали Лизоформин 3000 в концентрации 5%, время экспозиции 3 минуты.

При его использовании выход жизнеспособных эксплантов был максимальным и составлял около 90 %.

Стерилизацию растительного материала осуществляют при постоянном перемешивании, затем микрочеренки промывают стерильной водой. Наш опыт показал, что использование раствора Лизоформина, в отличие от Белизны, увеличивает число промываний стерильной водой от 2 до 3-4 раз, так как Лизоформин имеет достаточно сильный запах отдушки.

После экспланты помещают на поверхность агаризованной питательной среды и закрывают пробирки пищевой пленкой.

2. Состав питательных сред и условия культивирования на этапе микроразмножения

Составы питательных сред для определенных видов растений и типов тканей подбираются индивидуально в каждом конкретном случае (Калинин, 1980; Бутенко, 1986).

В зависимости от консистенции, среды могут быть жидкими или твердыми за счет внесения различных гелирующих агентов, чаще всего агар-агара (Бутенко, 1986, 1999).

В настоящее время известно большое число различных по составу питательных сред (Калинин, 1980), но наиболее часто применяется среда Т. Мурасиге и Ф. Скуга (1962). Эта среда содержит хорошо сбалансированный состав питательных веществ. Другие среды отличаются от нее, как правило, соотношением аммонийного и нитратного азота: среды Линсмайера и Скуга (Linsmaier, Skoog, 1965), WPM (Lloyd, McCown, 1980), QL (Quorin, Lepoivre, 1977), Грешоффа и Доя (ДВМ-1) (Gresshof, Doy, 1972), Нича (Nitsch, 1974), Хеллера (Heller, 1953), Шенка и Хильдебрандта (Schenk, Hildebrandt, 1972) (Калинин, 1980; Гамбург, 1990; Бутенко, 1999).

окислительно-восстановительных процессах метаболизма. В основном витамин С используют как мощный антиоксидант, чтобы предотвратить фенольное окисление растений, содержащих фенольные смолы. Однако витамин С нельзя использовать длительно, поскольку он может стать окислителем непосредственно.

Рибофлавин (витамин В₂, витамин G, C₁₇H₂₀N₄O₆) активен в углеводном обмене и важен для клеточного дыхания. Подобно прочим водорастворимым витаминам рибофлавин может синтезироваться в растениях, особенно на начальных этапах развития семян.

Аденин (витамин В₄, 6-аминопурин, C₅H₅N₅) важен для клеток растений как составляющая нуклеиновых кислот (ДНК и РНК). В культуре тканей имеет слабый цитокининовый эффект.

Д-пантотеновая кислота (витамин В₅, C₉H₁₆NO₅) – водорастворимый витамин, который является частью молекулы коэнзима А. Включение Д-пантотеновой кислоты в состав культуральных сред не имеет смысла на ранних стадиях развития проростков, вероятно некоторые растения могут синтезировать ее самостоятельно.

Также в отдельных случаях в состав питательных сред включают **фолиевую кислоту, цианокобаламин, инозитол, биотин, холин, α-токоферол** и др.

Аминокислоты – мономеры белков, некоторые из них, соединяясь с нуклеиновыми кислотами образуют нуклеопротеиды. На сегодняшний день известно 20 основных незаменимых аминокислот, многие из которых могут быть синтезированы искусственно. Все они представляют собой L-изомеры: L-аланин, L-аргинин, L-аспарагин, L-глутамин, L-лизин, L-пролин, L-серин, L-тирозин, L-цистеин, глицин и др.

Регуляторы роста (фитогормоны) — это вещества, вырабатываемые в процессе естественного обмена веществ и оказывающие в ничтожных количествах регуляторное влияние, координирующее физиологические процессы. В этой связи к ним часто применяется термин — природные регуляторы роста. В большинстве случаев, но не всегда фитогормоны образуются в одних клетках и органах, а оказывают влияние на другие. Иначе говоря, гормоны способны к передвижению по растению и их влияние носит дистанционный характер. Большинство физиологических процессов, в первую очередь рост, формообразование и развитие растений, регулируется гормонами. Известны следующие пять групп фитогормонов: ауксины, гиббереллины, цитокинины, абсцизовая кислота, этилен.

Наиболее широко в качестве регуляторов роста применяют ауксины, цитокинины (реже – гиббереллины) и их сочетания (табл.1).

Таблица 1.

Фитогормоны, используемые при культивировании клеток растений.

Класс	Название	Сокращение	Физиологическое действие
<i>Ауксины</i>	2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота	2,4-Д	деление, растяжение и дифференциацию клеток; явление апикального доминирования.
	Индолил-3-уксусная кислота	ИУК	
	3-Индолилмасляная кислота	ИМК	
	1-Нафтилуксусная кислота	НУК	
	β -Нафтоксиуксусная кислота	НОУК	
<i>Цитокинины</i>	6-Бензиламинопури	6-БАП	индукция деления клеток и участие в процессах органогенеза, наряду с ауксинами.
	6-Фурфуриламинопури (Кинетин)	Кинетин	
	2-Изопентениладенин	2-ip	
	Зеатин	Z	
<i>Гибберелины</i>	Гиббереловая кислота	ГК	для элонгации микропобегов перед этапом укоренения.

В прописи сред многие авторы кроме вышеперечисленных компонентов включают вещества неопределенного состава: пептон, гидролизат казеина, дрожжевой автолизат, картофельный экстракт, растительные соки, эндосперм кокосового ореха, гомогенат плодов банана.

одноглазковые черенки и меристематические участки апикальных и латеральных почек, а для получения каллусных культур – листья и фрагменты стебля. Оптимальный размер экспланта от 0,1 до 2 см.

Одним из наиболее ответственных этапов работы по культуре ткани является выбор сроков изоляции экспланта. Оптимальным сроком изоляции эксплантов актинидии является фаза начала активного роста (апрель-май). Выход жизнеспособных эксплантов при этом составил 83% (Малаева, 2008). Литературные данные подтверждают наши сведения. Экспланты, изолированные в эти сроки наименее подвержены отрицательным явлениям, связанными с процессами окисления и поликонденсации фенольных соединений (Высоцкий, 1989).

Ягодные культуры, лучше приживаются, когда в качестве первичных эксплантов используют узлы побегов текущего года в фазе активного роста (май-август).

В настоящее время разработано и используется различные схемы стерилизации в зависимости от специфики культуры и типа экспланта. Для стерилизации растительного материала чаще всего используют растворы хлорсодержащих веществ или соединений ртути. При подборе оптимального режима стерилизации необходимо учитывать биологические особенности растительных объектов (рис.6).

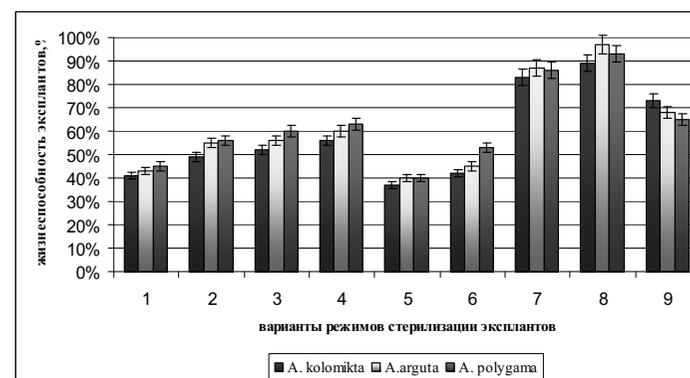


Рис. 6. Зависимость жизнеспособности эксплантов актинидии от режима стерилизации.

Условные обозначения: 1. белизна 35%, 5 мин. 2. белизна 35%, 10 мин. 3. белизна 50%, 3 мин. 4. белизна 50%, 5 мин. 5. хлорамин 5%, 5 мин.

III. Особенности клонального микроразмножения плодово-ягодных культур

В настоящее время актуальна разработка эффективных методов размножения и сохранения растений. Большой потенциал в этом плане имеет использование технологий, основанных на применении современных биотехнологических подходов. При этом клональное микроразмножение является наиболее эффективным методом имеющим значительные преимущества по сравнению с традиционными способами размножения.

Использование системы *in vitro* в современном садоводстве позволит получать оздоровленный посадочный материал, свободный от вирусов и патогенов, тиражировать материал, трудно размножаемый традиционными методами, создавать генетические коллекции и длительно хранить ценные генотипы (Высоцкий, 1998).

В настоящее время все большую популярность приобретают нетрадиционные садовые культуры, обладающие ценными и питательными свойствами.

Генетический банк плодово-ягодных культур Волгоградского регионального ботанического сада включает представителей следующих семейств: *Grossulariaceae* DC. (*Grossularia* Mill., *Ribes* L.) *Caprifoliaceae* Juss. (*Viburnum* L., *Lonicera* L.), *Rosaceae* Adans. (*Rubus* L., *Prunus* L.), *Actinidiaceae* Van-Tieghem (род *Actinidia* Lindl.).

1. Введение в культуру *in vitro*

Известно, что существует комплекс факторов, каждый из которых в отдельности и в сочетании с другими оказывает значительное влияние на развитие клеточных и тканевых систем *in vitro*. Среди них наиболее важными являются тип экспланта, физиологическое состояние донорных растений, условия культивирования растений *in vitro*, состав питательных сред и др. При этом степень влияния каждого из названных факторов зависит от генотипа (Орлов, 2006).

В качестве первичных эксплантов при клональном микроразмножении плодово – ягодных культур обычно используют

Для успешного размножения *in vitro* в большинстве случаев прописи сред приходится подбирать индивидуально для каждого вида и даже сорта растения.

Среды могут быть твердыми (агаризированными) или жидкими. Ткани, выращиваемые в жидких питательных средах, обычно культивируют в роллерах с круговым перемешиванием среды или в шейкерах вибрирующего типа, иногда используют стационарную среду, помещая ткань на мостики из фильтровальной бумаги. Жидкие питательные среды иногда используют для проращивания семян или укоренения растений. Для приготовления твердых питательных сред используют агар-агар – полисахарид, получаемый из морских водорослей или гельрайт. Обычно концентрация агара в среде составляет 6,5-7 г на 1 л раствора, а гельрайта – 3-4 г на 1 л раствора.

II. Особенности культивирования *in vitro* редких видов растений

Основной задачей ботанических садов в сохранении биологического разнообразия является комплексное изучение и сохранение генетических ресурсов природной флоры путем пополнения и поддержания коллекций живых растений, а также разработка оптимальных режимов долговременного хранения семян и меристем, обеспечивающих их жизнеспособность и стабильность. Особый интерес представляет изучение возможностей сохранения в генетических банках видов, естественное возобновление которых в природе ослаблено или затруднено. Для таких видов от устойчивости воспроизводства *ex situ* зависит сохранность их генофонда в целом (Белокурова, 2005; Виноградова, 2005).

Работа по созданию коллекции *in vitro* ГБУ ВО «Волгоградский региональный ботанический сад» ведется с 2005 года. На данный момент коллекция редких растений *in vitro* содержит 80 видов, относящихся к 26 семействам.

1. Введение в культуру *in vitro*

При подборе объектов исследования для создания коллекции *in vitro* редких видов растений, занесенных в Красную книгу Российской Федерации и региональные Красные книги следует руководствоваться следующими критериями:

1. принадлежность видов к одной из категорий редкости;
2. практическая ценность видов (декоративные, лекарственные и др.);
3. виды, трудно-размножаемые традиционными способами.

При создании генетических банков *in vitro* видов растений в качестве первичного экспланта предпочтителен семенной материал (Батыгина, 2002; Ишмуратова, 2009). Размножение *in vitro* растений с использованием в качестве эксплантов семян, обладающих различными типами покоя, без предварительной их обработки, позволяющей вывести семена из состояния покоя, практически невозможно.

спонтанное образование корней около 90% на различных прописях питательных сред без добавления фитогормонов.

Адаптацию регенерантов редких и исчезающих видов растений проводили при $t=25^{\circ}\text{C}$, освещенности 3 клк, влажности воздуха 80%. В качестве субстрата использовали смесь: торф; песок; дерновая земля (1:1:2).

Выход растений-регенерантов редких видов при этом составлял менее 50%.

В результате исследований модифицированы и адаптированы методики клонального микроразмножения некоторых редких и исчезающих видов растений. Установлено, что реализация морфогенетического потенциала у редких и исчезающих видов растений определяется видовыми особенностями исходных растений, типом экспланта, его физиологическим состоянием, составом питательных сред и условиями культивирования.

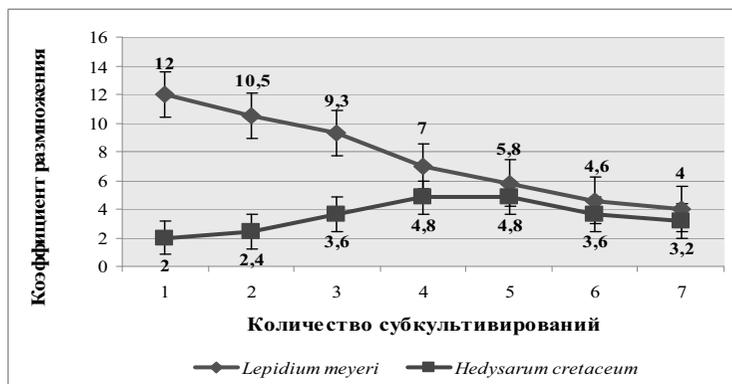


Рис. 5. Сравнение темпов развития *Lepidium meyeri* и *Hedysarum cretaceum* в зависимости от количества субкультивирований

4. Укоренение и адаптация микропобегов редких видов растений

Результаты экспериментов по подбору сред на этапе укоренения показывают значительные отличия процента укоренения в зависимости, как от видовых особенностей редких и исчезающих видов, так и от концентрации ауксинов, применяемых для индукции ризогенеза.

Модельными объектами для проведения экспериментов по укоренению были выбраны представители семейств *Ranunculaceae* и *Brassicaceae*. В ходе работы изучали влияние ИУК и ИМК на процесс ризогенеза. Укореняемые побеги *Lepidium meyeri* высаживали на питательные среды, минеральную основу которых составляла полная и разбавленная вдвое модифицированная среда Мурасиге и Скуга с добавлением 20 г/л сахарозы, 6,5 г/л агара и набора витаминов как в основной среде.

Наш опыт по укоренению редких видов растений показал, что при использовании полной минеральной основы MS требуются более высокие концентрации ауксинов – от 1,0 мг/л. Использование обедненных питательных сред – Уайта, ½ MS позволяют снизить концентрацию ауксинов – от 0,5 до 1,0 мг/л.

При культивировании однодольных растений следующих семейств: *Asphodelaceae*, *Iridaceae*, *Hyacinthaceae*, *Liliaceae*, *Orchidaceae*, *Melanthiaceae* на стадии собственно микроразмножения отмечали

Возможными подходами для нарушения покоя семян и повышения их всхожести в условиях культуры *in vitro* являются: а) нарушение покровов семян; б) воздействие низких положительных температур; в) экзогенная гормональная обработка семян; г) воздействие светом; д) использование свежесобранных семян; е) использование незрелых семян и культуры незрелых зародышей; ж) симбиотическое культивирование и др.

Обязательным условием микроклонального размножения является идентичность полученного растительного материала исходному материнскому растению (Атанасов, 1993). Используемые методы культуры ткани, состав питательных сред, условия культивирования не должны приводить к появлению соматоклональных вариаций (Кунах, 1997).

При выборе экспланта необходимо также учитывать его возраст, строение и происхождение. Чем сложнее устроено растение, например, травянистые многолетники (*Artemisia hololeuca*, *Helianthemum nummularium*, *Hypericum xylosteifolium*), имеющие систему надземных и подземных органов, тем больше эксплантов, возможных для введения в культуру *in vitro*, и шире диапазон их морфогенетических реакций в культуре тканей (Ишмуратова, 1998). Поэтому для однодольных растений (*Bulbocodium versicolor*, *Iris pumila*, *Gladiolus palustris*, *Eremurus spectabilis*) предпочтительно использовать культуру семян и изолированных зародышей.

В настоящее время рядом авторов проведены работы по выявлению общих закономерностей и специфических особенностей культивирования *in vitro* зародышей *Iris*, *Gladiolus*, *Belamcanda*, *Paeonia* и *Fritillaria* (Ветчинкина, 2004, 2010; Мамаева, 2008; Вечернина, 2006; Тихомирова, 2009, 2010; Сафронова, 2010).

В качестве первичных эксплантов в своих работах мы использовали части почек возобновления с кусочком донца из луковицы (*Bellevalia sarmatica*), сегменты листьев, частей околоцветника (*Iris pumila*, *Iris scariosa*) на разных стадиях развития (в фазе бутонизации или цветения). Для ряда видов (*Aristolochia manshuriensis*, *Aconogonon alpinum*) в качестве первичных эксплантов брали апикальные и

латеральные меристемы растений с интродукционного участка ГБУ ВО «ВРБС». При введении в культуру *Paeonia tenuifolia* и *Paeonia lactiflora* выявили высокую морфофизиологическую активность изолированных зародышей, зависящую от эндогенного содержания фитогормонов и срока их изоляции.

При работе с редкими и исчезающими видами растений наиболее доступным материалом, на наш взгляд, являются семена, собранные из природных мест обитания (табл. 2).

Таблица 2

Объекты исследования и типы культивируемых эксплантов

Объекты исследования	Типы эксплантов
<i>Lepidium meyeri</i>	семена
<i>Matthiola fragrans</i>	семена
<i>Silene cretacea</i>	семена
<i>Hedysarum cretaceum</i>	апикальные меристемы;
<i>Hedysarum grandiflorum</i>	апикальные меристемы, семена;
<i>Hedysarum Razoumivianum</i>	семена
<i>Bulbocodium versicolor</i>	семена, сегменты луковиц
<i>Clematis integrifolia</i>	апикальные меристемы пазушные почки
<i>Clematis orientalis</i>	
<i>Clematis recta</i>	
<i>Gladiolus tenuis</i>	изолированные зародыши
<i>Iris tenuifolia</i>	семена изолированные зародыши

При организации исследований также следует учитывать эколого-биологические особенности редких видов, особенности жизненной формы, что подтверждается другими исследователями (Ишмуратова, 1999, 2000; Молканова, 2008, 2009; Сафронова, 2010; Жолобова, 2012).

Объектами наших исследований являлись редкие виды растений следующих семейств: (*Fabaceae*, *Brassicaceae*, *Caryophyllaceae*, *Liliaceae*, *Hyacinthaceae*, *Iridaceae* и др.); и жизненных форм: прямостоячие кустарники (*Calophaca wolgaric*, *Genista tanaitica*), полукустарнички (*Lepidium meyeri*, *Silene cretacea*, *Hedysarum cretaceum*), стержнекорневые травянистые поликарпики (*Matthiola fragrans*, *Hedysarum grandiflorum*, *Astragalus dasyanthus*), короткокорневищные травянистые поликарпики

0,1	5,4 ± 0,3	4±0,3	4 ± 0,3	7,6±0,5	5,4±0,3	3,2±0,3	4,6±0,3
0,5	8,4 ± 0,6	12±0,3	6,8±0,7	43,2±1,9	12,4±0,5	5±0,4	9,2±0,4
1,0	17,4±0,9	12,4±0,6	19,6±0,8	19,4±0,8	29,4±1,1	4,6±0,3	32,4±0,4
2,5	35 ± 1,0	14,4±0,8	2,8±0,2	31,8±0,9	16,4±0,5	11,8±1,2	19,8±0,6
5,0	7,8 ± 0,5	34,8±1,3	-	22,6±1,0	-	-	33,8±0,6

Сравнительный анализ влияния видовых особенностей на коэффициент размножения редких и исчезающих видов растений показал различия как между близкородственными видами (представители рода *Hedysarum*), так и между видами, относящихся к разным семействам. При этом значения коэффициента размножения между близкородственными видами, в пределах одного семейства, отличались незначительно. Анализ полученных данных по интенсивности пролиферации между редкими видами различных семейств показал значительные отличия (коэффициент размножения между семействами *Caryophyllaceae* и *Fabaceae* отличался более чем в 6 раз – от 2 до 13,5). Такие различия позволили провести градацию между семействами по регенерационной активности в культуре *in vitro*.

3. Продолжительность пассажа

Важным показателем при культивировании редких видов является количество субкультивирований. При этом отмечали, темпы развития эксплантов при культивировании разных видов существенно отличаются. Так, если для *Lepidium meyeri* и *Matthiola fragrans* (представителей семейства *Brassicaceae*) максимальные значения коэффициента размножения (12;10,5) были зафиксированы на этапе введения в культуру и при первых субкультивированиях, то для представителей семейства *Fabaceae* (*Hedysarum grandiflorum*, *Hedysarum cretaceum*, *Astragalus dasyanthus*) характерна другая закономерность. Максимальный коэффициент размножения 4,8 приходился на 4-5 пассаж (рис. 5).

По интенсивности пролиферации изученные виды были условно разделены нами на три группы: первая группа включает представителей семейства *Caryophyllaceae* (*Silene cretacea*) и семейства *Brassicaceae* (*Lepidium meyeri*, *Matthiola fragrans*), $K_p \geq 7$; вторая группа включает виды семейства *Ranunculaceae* (*Clematis recta*, *C. orientalis*, *C. integrifolia*) – $4 \leq K_p \leq 7$; к третьей группе с самой низкой регенерационной способностью относятся виды семейства *Fabaceae* (*Calophaca wolgarica*, *Hedysarum grandiflorum*, *Hedysarum cretaceum*) (рис. 4).

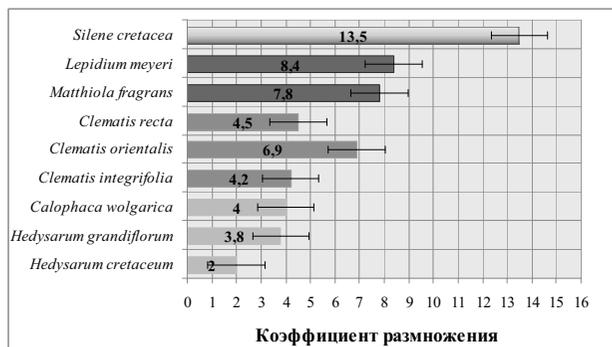


Рис. 4. Коэффициент размножения редких и исчезающих видов растений на среде с добавлением 0,5 мг/л 6-БАП

Наш опыт культивирования редких видов растений показал наличие положительного эффекта при совместном использовании 6-БАП и ИУК. Максимальный коэффициент размножения на средах, содержащих только 6-БАП, составил 35 (концентрация 6-БАП – 2,5 мг/л), при совместном использовании 6-БАП и ИУК максимальный коэффициент размножения составил 43,2 (табл. 3).

Таблица 3.

Влияние концентрации 6-БАП и ИУК на коэффициент размножения *Lepidium meyeri*

6-БАП (мг/л)	Концентрация ИУК (мг/л)						
	0	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9	1,0
0	1,1 ± 0,1	1,1±0,1	1,1±0,1	1,1±0,1	1,1±0,1	1,1±0,1	1,1±0,1

(род *Iris* L.), луковичные и клубнелуковичные поликарпики (*Bellevalia sarmatica*, *Allium regelianum*, *Tulipa gesneriana*).

2. Культивирование редких видов на этапе микроразмножения

На этапе микроразмножения для редких видов растений предпочтительно использование следующих минеральных основ питательных сред: Уайта (White, 1943), Гамборга и Эвелега (Gamborga, Eveleigh, 1968), Мурасига Скуга (Murashige, Skoog, 1962), Рандольфа и Кокса (Randolph, Cox, 1943), Кнутсона (Knudsona, 1925), Нича (Nitsch, 1974), Хеллера (Heller, 1953), Андерсона (Anderson, 1980).

Основа питательной среды Мурасиге – Скуга по литературным данным наиболее универсальна и поэтому часто используется при культивировании различных видов растений.

При культивировании растений класса Однодольные мы использовали основы питательных сред Кнутсона и Гамбурга. Так для культивирования *Iris pumila* использовали следующие варианты сред:

1. Питательная среда Мурасиге – Скуга (МС) без добавления фитогормонов;
2. Питательная среда Гамбурга (В5) без добавления фитогормонов;
3. Питательная среда Кнутсона (Кн) без добавления фитогормонов (агар 10%);
4. Питательная среда Мурасиге – Скуга (МС) с добавлением 0,1 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП) и 0,1 мг/л индолилуксусной кислоты (ИУК);
5. Питательная среда Мурасиге – Скуга (МС) с добавлением 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП);
6. Питательная среда Мурасиге – Скуга (МС) с добавлением 0,3 мг/л 2 изопентениладенин (*2-ip*).

Установлено, что длительное культивирование растений на средах, содержащих цитокинины приводило к появлению большого количества различных аномалий развития и, как следствие, остановка роста растений. В некоторых случаях отмечено появление морфогенного каллуса,

образование которого ингибировало нормальное развитие растений, что согласуется с данными других исследователей (рис. 1)

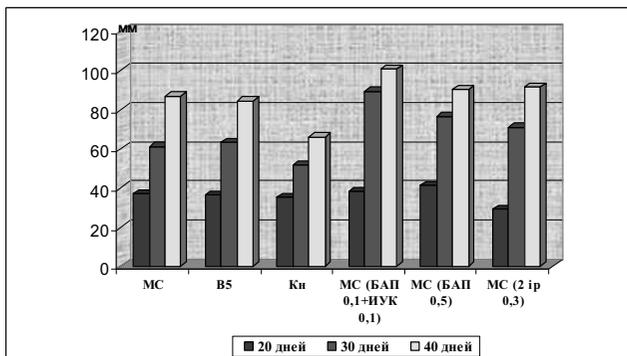


Рис.1 Изменение длины наиболее развитого листа у проростков *Iris pumila*, культивируемых на различных вариантах питательных сред.

На питательных средах, не содержащих фитогормонов отмечали равномерный рост растений (рис.1), наибольшие показатели длины первого листа и количества листьев были отмечены на питательной среде МС. Однако на этой питательной среде, при культивировании растений более месяца наблюдалось большое количество обводненных побегов и большое число отмерших листьев. На питательной среде Кн наблюдался замедленный, но равномерный рост растений, при этом через 1 месяц культивирования растения были нормальной морфологии и низким числом отмерших листьев (рис.2).

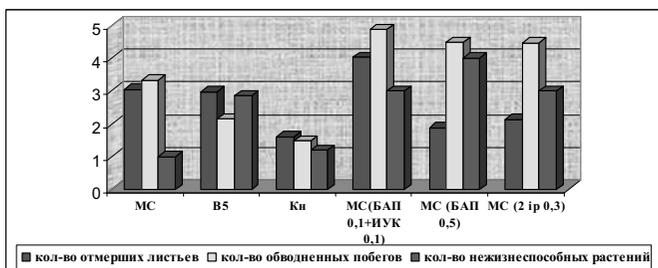


Рис.2 Нарушение роста и развития у проростков *Iris pumila* на экспериментальных питательных средах.

На питательной среде МС (БАП 0,1+ИУК 0,1) развитие растений было динамичным (рис.1), показатели длины первого листа были

наибольшими из всех вариантов питательных сред, но и показатели развития нарушений в росте и развитии растений (рис.2) были одни из самых высоких.

В результате проведенных исследований установлено, что оптимальной питательной средой для рода *Iris* является питательная среда Кнудсона. На данной среде у растений наблюдается медленный равномерный рост, при этом количество аномальных и нежизнеспособных растений минимально, что в свою очередь позволяет сохранять коллекцию *in vitro* длительное время.

Из всех исследуемых цитокининов наибольший коэффициент размножения – 4, наблюдали при использовании 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л (рис. 3). При этом отмечали изменения в морфологии побегов: междоузлия побегов сокращались, уменьшались размеры листьев, изменилась их форма. Кроме того, у половины побегов при концентрации 1,0 мг/л 6-БАП наблюдалась витрификация побегов.

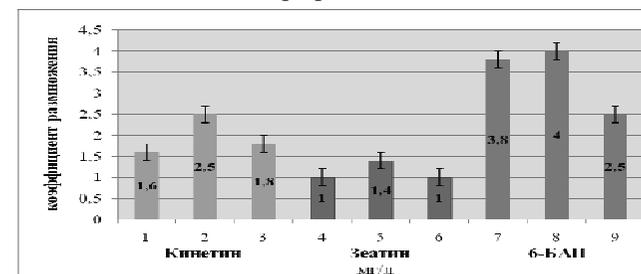


Рис. 12. Влияние различных цитокининов на коэффициент размножения *Calophaca wolgarica*

Условные обозначения: 1 – кинетин 1,0 мг/л; 2 – кинетин 2,0 мг/л; 3 – кинетин 5,0 мг/л; 4 – зеатин 0,1 мг/л; 5 – зеатин 0,5 мг/л; 6 – зеатин 1,0 мг/л; 7 – 6-БАП 0,1 мг/л; 8 – 6-БАП 0,5 мг/л; 9 – 6-БАП 1,0 мг/л.

В качестве вторичных эксплантов брали фрагменты побега длиной 7-10 мм. Оптимальным временем пассажа для *C. wolgarica* является 30-35 дней. В дальнейшем увеличение коэффициента размножения не происходило, и замедлялись темпы роста. Кроме того, у значительной части растений *in vitro* наблюдали подсыхание листьев (40%).