

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
РЕСПУБЛИКИ КРЫМ
«ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ НИКИТСКИЙ
БОТАНИЧЕСКИЙ САД – НАЦИОНАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР»**

На правах рукописи

ТЕВФИК Арзы Шевкиевна

**ИНДУКЦИЯ МОРФОГЕНЕЗА *IN VITRO* И РЕГЕНЕРАЦИЯ РАСТЕНИЙ
В КУЛЬТУРЕ ВЕГЕТАТИВНЫХ ПОЧЕК И ЗАРОДЫШЕЙ КАННЫ
САДОВОЙ (*CANNA* × *HYBRIDA HORT EX BACKER*)**

**Специальность: 03.02.01 – ботаника
03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)**

**Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

**Научный руководитель:
МИТРОФАНОВА Ирина Вячеславовна
доктор биологических наук**

Ялта – 2016

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
РАЗДЕЛ 1. ОСОБЕННОСТИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ ПОРЯДКА ИМБИРЕЦВЕТНЫХ (ZINGIBERALES) И НЕКОТОРЫХ КОРНЕВИЩНЫХ КУЛЬТУР В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i> И ОСНОВНЫЕ ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ РАЗЛИЧНЫЕ ПУТИ РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	12
1.1. Типы и этапы клонального микроразмножения.....	13
1.2. Роль генотипа, типа первичного экспланта в процессе регенерации растений	14
1.3. Особенности и условия получения асептической культуры.....	16
1.4. Основные факторы культивирования органов и тканей растений, их влияние на морфогенетический потенциал на разных этапах размножения растений представителей порядка Имбирецветных.....	20
1.5. Особенности проращивания семян <i>in vitro</i> и эмбриокультура.....	27
1.6. Реализация морфогенеза растений <i>in vitro</i> через соматический эмбриогенез.....	30
1.7. Условия депонирования растений.....	33
1.8. Условия адаптации растений, полученных <i>in vitro</i>	36
РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	40
РАЗДЕЛ 3. ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ИНДУКЦИЮ РАЗВИТИЯ ЭКСПЛАНТОВ <i>CANNA</i> × <i>HYBRIDA HORT. EX BASKER</i> В УСЛОВИЯХ <i>IN VITRO</i>	52
3.1. Разработка протокола получения асептической культуры вегетативных почек и верхушек активно растущих побегов.....	52
3.2. Влияние срока отбора и генотипа на процесс регенерации микропобегов	57

РАЗДЕЛ 4. ИЗУЧЕНИЕ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОТЕНЦИЙ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ КАННЫ САДОВОЙ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ.....	62
4.1. Влияние регуляторов роста на процесс регенерации микропобегов из вегетативных почек на этапах индукции их развития и собственно микроразмножения.....	63
4.2. Индукция прорастания зрелых семян <i>in vivo</i> , незрелых и зрелых семян, изолированных зародышей в асептических условиях культивирования.....	78
4.3. Выявление морфогенетического потенциала высечек листа и сегментов бутонов и завязей	88
РАЗДЕЛ 5. УКОРЕНЕНИЕ МИКРОПОБЕГОВ <i>IN VITRO</i> И АДАПТАЦИЯ РЕГЕНЕРАНТОВ КАННЫ САДОВОЙ К УСЛОВИЯМ <i>IN VIVO</i>.....	92
5.1. Ризогенез у микропобегов <i>in vitro</i>	92
5.2. Адаптация растений <i>in vivo</i>	97
РАЗДЕЛ 6. МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА, ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВОДНОГО РЕЖИМА И ФОТОСИНТЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ <i>CANNA×HYBRIDA HORT. EX VASCKER</i> ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ <i>IN VITRO</i> И <i>IN VIVO</i>.....	102
6.1. Результаты исследования морфологических и структурных характеристик некоторых сортов <i>Canna x hybrida hort. ex Vacker</i>	102
6.2. Анализ параметров водного режима и фотосинтетической активности канны садовой.....	107
РАЗДЕЛ 7. ОСОБЕННОСТИ ДЕПОНИРОВАНИЯ КАННЫ САДОВОЙ	110
РАЗДЕЛ 8. АНАЛИЗ И ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	116
ВЫВОДЫ.....	127
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	129
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	130
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	169

ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	170
ПРИЛОЖЕНИЕ Б. ВЛИЯНИЕ СРОКОВ ОТБОРА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ЧАСТОТУ КОНТАМИНАЦИИ ЭКСПЛАНТОВ КАННЫ САДОВОЙ.....	171
ПРИЛОЖЕНИЕ В.....	172
ПРИЛОЖЕНИЕ Г. ТИПЫ ЭКСПЛАНТОВ, ОБЛАДАЮЩИЕ НИЗКИМ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ.....	174
ПРИЛОЖЕНИЕ Д. ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДОМ ПОЛЯРИЗАЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ КРАХМАЛЬ- НЫХ ЗЕРЕН ТКАНЕЙ СЕМЯДОЛИ КАННЫ САДОВОЙ.....	177

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота

БАП – 6-бензиламинопурин

ГК₃ – гибберелловая кислота, гиббереллин

2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота

ИМК – β -индолил-3-масляная кислота

ИУК – β -индолил-3-уксусная кислота

лк – люкс (кд ср/м^2)

М – моль/л

МС – состав среды по Murashige, Skoog (1962)

СУВР – стеллаж ускоренного выращивания растений

NaClO – гипохлорит натрия

НУК – α -нафтилуксусная кислота

ТДЗ – тидиазурон

ССС – (2-хлорэтил)-триметиламоний хлорид

pH – отрицательный десятичный логарифм концентрации ионов водорода

WPM – состав среды по Lloyd, McCown (1980)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Одной из важнейших проблем современности является сохранение и увеличение биоразнообразия, в том числе фиторазнообразия, для чего используются различные направления биологической науки: ботаника, генетика, селекция, интродукция, биотехнология и т.д. Приоритетное направление при этом приобретает биотехнология благодаря ряду существенных преимуществ: биотехнологические процессы обладают низкой энергоемкостью, почти безотходны, экологически чистые, имеют возможность проведения исследований круглый год, культивируемые растения занимают при этом незначительные площади. Среди биотехнологий культура клеток, органов и тканей растений имеет как фундаментальное так и прикладное значение, и в последние годы активно применяется в разных областях хозяйственной деятельности человека для получения веществ вторичного синтеза (алкалоиды, стероиды, гликозиды, гормоны, эфирные масла и др.), ускоренного размножения культур, трудноразмножаемых традиционными методами, оздоровления растительного посадочного материала, использования изолированных культур в генетико-селекционной работе и создания генобанков *in vitro* (Бутенко, 1962, 1964; Катаева, 1983; Калинин и др., 1992; Кунах, 2005; Митрофанова, 2011; Игнатова, 2011; Plant ..., 1984; Lombardi, 2001; Basal, 2007; Cruzz-Cruzz et al., 2013; Protocols ..., 2014).

Канна садовая (*Canna × hybrida hort. ex Backer*) – одна из красиво и длительно цветущих, декоративно-лиственных культур. При оформлении садов и парков канны создают крупные красочные массивы благодаря ярким цветкам и соцветиям разнообразных форм и окрасок, сизо-зеленым или фиолетово-красным, бананоподобным листьям, напоминающим растения флоры тропической зоны (Дашкеев, 1975; Шолохова, 2006).

Никитский ботанический сад – Национальный научный центр (НБС-ННЦ) является одним из ведущих учреждений, занимающихся интродукцией и селекцией канны садовой. Ценность генофонда Никитского ботанического сада определяется не только количеством сортообразцов, но и гибридным материалом, созданным сотрудниками Сада (Феофилова, 1972, 1997; Шолохова, 2001). В настоящее время коллекционный генофонд канны представлен 55 сортообразцами, в том числе 6 природными видами, 26 сортами селекции НБС-ННЦ и 23 сортами зарубежной селекции. Существующие сорта канны садовой получены в результате межвидовых и межсортовых скрещиваний. Часть гибридов не дает полноценных семян. Эта декоративная культура хорошо переносит пониженную влажность воздуха, и практически не повреждается вредителями (Феофилова, 1973, 1977, 1997; Дашкеев, 1975; Садыхов, 1985; Шолохова, 2006). Однако имеются литературные данные о значительном поражении листьев и соцветий канны грибной, бактериальной и вирусной инфекцией (Митрофанова, 2012; Lockhart, 1988, 1990; Reichel et al., 1996; Soares, 2005; Monger et al., 2007, 2010; Borroto-Fernandez et al., 2008; Marino et al., 2008).

Степень разработанности темы. На протяжении последних двадцати лет учёные ряда зарубежных стран занимались разработкой и совершенствованием отдельных этапов клонального микроразмножения *Canna indica* L. и *Canna edulis* Ker. Наиболее весомый вклад в изучение данного вопроса внесли биотехнологи Польши (Kromer, 1979; Kromer, Kukulczanka, 1985) и Китая (Hosoki, Sasaki, 1991; Wang, 2008). Тем не менее для *C. hybrida* в основном исследованы вопросы традиционной селекции и размножения (Феофилова, 1987; Khoshoo, Mukherjee, 1970), и различные аспекты репродуктивной биологии (Никифоров, 1982; Кузьмина, 2013; 2014).

Однако для *C. hybrida* практически не изучены вопросы морфогенеза *in vitro*, что может быть основой для разработки биотехнологических приемов клонального микроразмножения. Эти исследования позволяют получить высококачественный материал в более сжатые сроки, а также важны для ускорения селекционного процесса и поддержания коллекций *in vitro* и *in situ*.

Цель и задачи исследования. Цель исследования – выявить пути морфогенеза, особенности регенерации различных эксплантов в культуре *in vitro* и разработать биотехнологические приёмы микроразмножения и сохранения перспективных сортов канны садовой.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить такие задачи:

- подобрать оптимальные типы эксплантов, режим стерилизации и получить асептическую культуру первичных эксплантов канны садовой;
- изучить особенности роста и развития различных эксплантов канны садовой в культуре *in vitro*;
- изучить влияние биотических и абиотических факторов на разных этапах морфогенеза *in vitro* канны садовой;
- определить возможности и пути дифференциации в условиях *in vitro* различных органов и тканей канны садовой;
- подобрать условия адаптации *in vivo* регенерантов канны садовой;
- провести сравнительный анализ морфологических и физиологических особенностей регенерантов *in vitro* и *in vivo* канны садовой;
- изучить особенности депонирования эксплантов канны садовой для создания медленнорастущей коллекции *in vitro*;
- разработать схемы микроразмножения растений 3 сортов канны садовой.

Научная новизна полученных результатов. Впервые для 4 перспективных сортов канны отечественной и зарубежной селекции определены морфогенетические потенции органов и тканей *in vitro* и показаны возможные пути морфогенеза *in vitro*: формирование меристемоидов, адвентивных почек и развития проростков из зиготических зародышей. Установлено влияние физических и гормональных факторов на отдельные этапы регенерации растений из вегетативных почек и зиготических зародышей. Определены оптимальные концентрации регуляторов роста (БАП, ТДЗ, НУК, ИУК), индуцирующих процесс прямого и непрямого органогенеза *in vitro*. В

результате сравнительного изучения показаны структурные и функциональные изменения растений канны садовой *in vitro* и *in vivo*. Выявлен сорт канны садовой (Ливадия), который обладает лабильным водным режимом и наибольшей адаптационной способностью к изменяющимся условиям культивирования. Определены оптимальный тип и концентрации ретардантов для депонирования двух сортов канны садовой.

Теоретическая и практическая значимость работы. Показаны пути реализации морфогенеза различных эксплантов в условиях *in vitro*. Подобраны составы питательных сред для получения и размножения растений канны *in vitro*. Использование метода эмбриокультуры позволило получить жизнеспособные проростки канны садовой сорта Дар Востока и Ливадия, что является основой создания новых селекционных форм. Показана возможность адаптации регенерантов канны садовой. Разработана и представлена биотехнологическая схема клонального микроразмножения канны садовой. Заложены в генобанк *in vitro* 3 сорта канны садовой. Результаты проведенных исследований используются при чтении курса биотехнологии растений в Крымском аграрном университете.

Методология и методы исследования. Применены методы культуры органов и тканей растений, эмбриокультура, методы световой и поляризационной микроскопии, методы морфо-анатомического и физиологического анализа растительного материала, методы депонирования. Достоверность результатов исследования получена с использованием метода статистического анализа.

Положения, выносимые на защиту:

1. Особенности получения растений-регенерантов канны садовой (*Canna* × *hybrida hort.* ex Backer) в культуре зародышей и вегетативных почек.
2. Пути морфогенеза канны садовой в условиях *in vitro*.
3. Морфологическая и физиологическая характеристика регенерантов канны при культивировании *in vitro* и *in vivo*.
4. Депонирование *in vitro* эксплантов канны садовой для создания банка генетической плазмы.

Апробация результатов диссертации. Материалы диссертации были представлены на следующих научных конференциях: научно-практическом семинаре молодых ученых и студентов Крыма «Биологические науки: современное состояние, проблемы и перспективы исследований в Крыму» (Ялта, 2012); международной научной конференции «Дендрология, цветоводство и садово-парковое строительство» (Ялта, 2012); международной конференции, посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси «Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры» (Минск, 2012); международной научно-практической конференции «Клеточная биология и биотехнология растений» (Минск, 2013); научно-практическом семинаре молодых ученых и студентов Крыма «Биологические науки: современное состояние, проблемы и перспективы исследований в Крыму» (Ялта, 2013); VI Международной научной конференции «Цветоводство: традиции и современность» (Волгоград, 2013); II Всеукраїнський науково-практичної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Біотехнологія: звершення та надії» (Київ, 2013), международной научно-практической конференции молодых ученых «Проблемы и перспективы исследований растительного мира» (Ялта, 2014), the VI International Scientific and Practical Conference «Biotechnology as an instrument for plant biodiversity conservation physiological, biochemical, genetic and legal aspects» (Yalta, 2014), VIII Съезда ОФР России и Всероссийской научной конференции «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 2015), 6th International ISHS Symposium «Production and Establishment of Micropropagated plants» (Sanremo. Italy, 2015).

Личный вклад автора. Разработка схем и постановка экспериментов, анализ литературных источников, сбор и интерпретация основных результатов исследований (включая статистическую обработку данных), представленных в диссертационной работе, выполнены и получены лично автором на базе лаборатории биотехнологии и вирусологии растений Никитского

ботанического сада за период 2010-2015 гг. Гистологический анализ был проведен совместно с кандидатом биологических наук, старшим научным сотрудником лаборатории репродуктивной биологии и физиологии растений Кузьминой Татьяной Николаевной. Морфо-анатомические и физиологические исследования регенерантов канн садовой осуществляли совместно с младшим научным сотрудником лаборатории репродуктивной биологии и физиологии растений Браилко Валентиной Анатольевной.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 научных работ, в том числе 8 статей в журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа изложена на 177 страницах машинописного текста, состоит из введения, 8 разделов, выводов, практических рекомендаций, приложения, списка использованной литературы (350 наименований, в том числе – 255 иностранных авторов) и включает 29 таблиц и 48 рисунков.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю д.б.н. Митрофановой Ирине Вячеславовне за оказанную помощь и руководство в процессе выполнения и написания диссертации. Выражаю признательность научному сотруднику лаборатории цветоводства Зубковой Наталье Васильевне за любезно предоставленные исходные растения канн садовой, а также выражаю свою благодарность всем сотрудникам лаборатории биотехнологии и вирусологии за неоценимую помощь при выполнении и обсуждении работы.

РАЗДЕЛ 1

ОСОБЕННОСТИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ ПОРЯДКА ИМБИРЕЦВЕТНЫХ (ZINGIBERALES) И НЕКОТОРЫХ КОРНЕВИЩНЫХ КУЛЬТУР В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* И ОСНОВНЫЕ ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ РАЗЛИЧНЫЕ ПУТИ РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

В настоящее время клональное микроразмножение ценных сортов декоративных растений имеет широкое применение в различных отраслях сельского хозяйства и декоративного садоводства. Этот метод представляет собой массовое бесполое размножение растений в культуре органов и тканей, в основе которого лежит тотипотентность — уникальное свойство растительной клетки реализовать генетическую информацию, что обеспечивает дифференциацию клетки и развитие ее в целый организм (Бутенко, 1975; Биотехнология сельскохозяйственных растений, 1998; Шевелуха, 1993; Черевченко, 2008).

Кроме теоретического направления, практическое применение биотехнологических методов позволяет получать оздоровленный посадочный материал, депонировать наиболее ценные сорта и поддерживать их в виде медленнорастущих коллекций *in vitro*.

Известно, что семена канн садовой (*Canna × hybrida hort. ex Backer*) прорастают трудно, через несколько месяцев, а иногда в течение всего года, в зависимости от условий их проращивания. Вместе с тем существующие сорта канн являются результатом многих межвидовых и межсортных скрещиваний, семенное потомство которых бывает гетерозиготным в первом поколении с расщеплением признаков в последующих (Дашкеев, 1975; Ерушкевич, 1983; Садыхов, 1985).

Успешное размножение канн возможно с применением методов культуры органов и тканей, что позволяет оздоровить растения и получить посадочный материал в большем количестве и в более сжатые сроки, чем при использовании

традиционных методов размножения; сэкономить время и снизить потери на этапе укоренения растений; ускорить селекционный процесс и депонировать ценные сорта в виде медленно растущих коллекций или путём криосохранения.

Для ряда растений представителей порядка Имбирецветных (Zingiberales) учёными разных стран разработаны и продолжают совершенствоваться методы размножения, в том числе и с применением методов культуры органов и тканей. Такие исследования проведены на таких культурах, как банан (*Musa sp.*, *Musa × paradisiaca*) (Braga et al., 2001; Helliott et al., 2001; Saha-Roy et al., 2010), имбирь (*Zingiber officinale* Rosc.) (Chan, Weng, 2004; Xuan et al., 2004; Resmi et al., 2005), альпиния (*Alpinia zerumbet* Burt and Smith) (Arannat, 1994; Victyrio et al., 2011), стрелиция (*Strelitzia reginae* Banks ex Aiton) (Ziv, Halevy, 1983; Karnataka, 2008), геликония (*Heliconia standleyi* Macbride) (Reshmi, Sheela, 2010), маранта (*Maranta leuconeura*) (Ebrahim, Ibrahim, 2010), костус *Costus speciosus* (Koen.) Sm. (Punyarani, Sharma, 2010), этлингера (Sanjaiban, Chidburee, 2002). В данном литературном обзоре представлены результаты использования биотехнологических методов в ускоренном размножении некоторых корневищных декоративных растений.

1.1. Типы и этапы клонального микроразмножения

На основе изучения морфогенетических процессов, происходящих в культуре органов и тканей субтропических и тропических растений Литцем (Litz et al., 1986) было предложено три типа клонального микроразмножения:

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

б) органогенез – процесс образования *de novo* адвентивных побегов в неорганизованно растущей массе каллусных клеток или непосредственно из тканей различных типов эксплантов;

в) соматический эмбриогенез – процесс асексуального развития зародышеподобных структур как из репродуктивных, так и из соматических тканей путем, напоминающим зиготический эмбриогенез.

По данным Р.Г. Бутенко, Ф.Л. Калинина, Н.В. Катаевой и ряда других авторов (Бутенко, 1964, 1999; Калинин и др., 1980; Катаева, Бутенко, 1983; Уоринг, Филипс, 1984; Батыгина, Васильева, 2002) процесс клонального микроразмножения растений включает следующие этапы:

- 1) введение первичного экспланта в условия *in vitro* (получение стерильной культуры, последующая регенерация и рост культивируемых органов и тканей);
- 2) собственно микроразмножение;
- 3) укоренение микропобегов и адаптация полученных регенерантов к условиям *in vivo*.

Каждый этап клонального микроразмножения, как правило, осуществляют в условиях *in vitro* на разных по составу питательных средах. Приведённая схема может видоизменяться в зависимости от особенностей объекта, методов и целей эксперимента (Митрофанова, 2011; Иванова и др, 2014; Doods, Roberts, 1985).

1.2. Роль генотипа, типа первичного экспланта в процессе регенерации растений

Среди факторов, оказывающих влияние на регенерацию *in vitro* микропобегов на начальном этапе культивирования, важную роль играет генотип и тип экспланта исходного растения (Калинин и др., 1992; Митрофанова, 2011; Gubbuk, Pekmezci, 2004, 2006; Mukunthakumar, Seeni, 2005; Ziv, 2006).

Различная способность к каллусообразованию *in vitro* растений некоторых сортов имбиря *Zingiber officinale* Roscoe (Fulbaria, Sherpuri, Chittagongi, Jangli, Indian, China, Sherpuri и BARI ada-1) P. Anasori и G. Asghari отмечена при культивировании сегментов листьев и корней. Так, каллус большего размера был получен у сортов Indian (8,98 мм) и Chittagon (8,56 мм), образование которого было инициировано из листа. Вместе с тем, сегменты корня ‘Sherpuri’ обладали наименьшей способностью к каллусообразованию (Anasori, Asghari, 2008).

В. Suma и др. инициировали образование эмбриогенного каллуса из высечек листа, сегментов ложностебля и вегетативных почек, отобранных в условиях *in*

vitro *Z. officinale* сорта Rio-de-Janeiro. В результате исследований было выявлено, что при использовании в качестве экспланта вегетативных почек был получен эмбриогенный каллус большего размера, из которого микропобеги регенерировали активнее, по сравнению с другими типами эксплантов (Suma et al., 2008).

Для введения в культуру *in vitro* маранты *Maranta arundinacea* L. использовались следующие типы эксплантов: меристемы побегов, сегменты стебля, цветка, черешка и высечки листьев. Для инициации развития этих эксплантов использовали питательную среду МС с добавлением 4 мг/л бензиладенина (БА) + 0,2 мг/л НУК. Автором выявлено, что сегменты черешка и высечки листа не обладали морфогенной способностью (Simin, 1996).

В качестве эксплантов геликонии *Heliconia psittacorum* L.f. были использованы тонкие срезы 1 мм ложностебля. Уже через 11 недель культивирования путем прямого органогенеза были получены полноценные микропобеги геликонии (Guzmán et al., 1998). В случае использования других эксплантов было отмечено, что завязи геликонии *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros сорта Sexy Pink имели лучшую способность к каллусообразованию на питательной среде с 1 мг/л ИУК + 10 мг/л 2,4-Д и 2 мг/л ИУК + 5 мг/л 2,4-Д по сравнению с сортом Sexy Scarlet. Однако в результате проведенных гистологических исследований было выявлено, что формирующийся каллус не содержал эмбриогенные клетки (Ulisses et al., 2007).

У стрелиции *Strelitzia reginae* Banks для введения в культуру *in vitro* использовали следующие типы эксплантов: вегетативные почки, высечки листа и изолированные зародыши. В результате проведенных исследований авторами было выявлено, что высечки листа и вегетативные почки не обладают регенерационным потенциалом. Было установлено, что 20 недель после опыления являются лучшим сроком отбора исходного материала (семян) (Oliveira Paiva et al., 2004).

Результаты исследований L. Resmi и A.S. Nair показали, что сорта банана *Musa spp.* имеют разный морфогенетический потенциал в зависимости от состава питательной среды. Так, экспланты диплоидного сорта Sannachenkadali, AA способны образовывать максимальное количество дополнительных побегов

при добавлении в среду 2 мг/л БА, экспланты триплоидного сорта (Red banana, AAA) – 5 мг/л БА (Resmi, Nair, 2007). По данным К. Hirimburegama и N. Gamage существует закономерность, которая показывает, чем больше 'В' геномов в группе геномов сорта банана, тем ниже коэффициент размножения в условиях *in vitro* (Hirimburegama, Gamage, 1997). При использовании в качестве эксплантов банана 'Nanjanagudu Rasabale' высечек листа, на питательной среде, содержащей МС с добавлением 7,06 мг/л БАП, L. Venkatachalam и др. было получено 80 регенерантов/эксплант (Venkatachalam et al., 2007). Наряду с этим, культивирование мужских цветков банана сорта Sabri позволило через непрямой органоогенез регенерировать растения, пригодные к посадке в условия *in vivo* (Sultan et al., 2011).

При разработке клонального микроразмножения имбиря *Z. officinale* в качестве эксплантов использовали вегетативные почки, меристемы, сегменты ложностебля и высечки листа. Каллусообразование было отмечено у всех типов эксплантов кроме высечек листа на питательной среде МС с добавлением 1-2 мг/л 2,4-Д и в комбинации 0,5-3,0 мг/л БАП (Tyagi et al., 2006).

Результаты проведенных опытов S. Titov и др. с цветочными почками банана сорта Kanthali показали, что через 3 недели культивирования авторы наблюдали образование каллуса, некоторые участки которого через 4 недели культивирования формировали эмбриогенные структуры (Titov et al., 2006). При культивировании вегетативных почек *Paeonia* было выявлено, что на этапе собственно микроразмножения генотип (сорта CoLo, Bartzella, GoBa и JuRo) не имеет существенного влияния на количество образовавшихся почек *de novo*. Вместе с тем, изучаемые сорта обладали разной способностью на этапе корнеобразования (Lescano et al., 2006).

1.3. Особенности и условия получения асептической культуры

Основное требование при введении первичного экспланта в условия *in vitro* является отсутствие патогенов, что обычно достигается поверхностной

стерилизацией исходного растительного материала дезинфицирующими агентами. Подобранный препарат, обладающий стерилизующим эффектом, должен не только освобождать экспланты от контаминации, но и максимально сохранять жизнеспособность клеток растения (Бутенко, 1964; Митрофанова, 1997).

Представители семейства *Zingiberales* являются полурозеточными геофитами, то есть это травянистые растения, у которых орган вегетативного возобновления — корневище (наиболее используемый исходный материал для введения в условия *in vitro*) — развивается на некоторой глубине под землей. В связи с высокой частотой контаминации экспланты этих растений необходимо подвергать более суровой стерилизации, чтобы избавиться от бактериальной и грибной инфекции (Rodrigues, 2005; Nietsche et al., 2006).

Для получения стерильного растительного материала чаще всего применяются растворы, содержащие активный хлор: гипохлориты натрия (NaClO) и кальция ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) (Катаева, Бутенко, 1983; Rescarolli, Zaffari, 2009). Так, для стерилизации геликонии *Heliconia standleyi* Macbride были использованы три концентрации (1, 2 и 3%) гипохлорита натрия в трех экспозициях (10, 20 и 30 мин). Лучшие результаты были получены при применении 2% NaClO в течение 20 мин, чем удалось снизить частоту контаминации до 5%. При этом, на 30 сут культивирования исследователи выявили 15% потемневших эксплантов (меристем) (Sosa-Rodríguez et al., 2009). Эффективной оказалась стерилизация вегетативных почек банана (*Musa AA*) сортов Kluai Sa и Kluai Leb Mue Nang 1,5% раствором гипохлорита натрия в течение 20 мин, затем снизить концентрацию раствора до 0,5% с экспозицией 5 мин (Gubbuk, Pekmezci, 2004). Вместе с тем, имеется ряд сообщений, в которых упоминается эффективная стерилизация вегетативных почек представителей порядка *Zingiberales*: *Rathambala (Musa AAA)* (Abeyarathe, Lathiff, 2002), *Z. officinale* (Minas, 2009), *Zingiber petiolatum* (Prathanturarug et al., 2004), *Alpinia purpurata* K. Schum (Illg, Faria, 1995), *Renealmia alpinia* Rottb) (Alaron et al., 2008) 1-2,5% раствором NaClO с экспозицией 20-50 мин.

Известно, что в стерилизующие растворы нередко добавляют 1-2 капли детергента Tween-20 (Sigma, USA), что повышает эффективность их действия

(Sharma, Singh, 1997; Prathanturarug et al., 2004). Вместе с тем, встречаются сообщения о добавлении в качестве детергента Labolene (Glaxo India, Bombay) (Anish et al., 2004; Kavyashree, 2009) и Teepol (Qualigen, India) (Rout et al., 1998; Kochuthressia et al., 2010).

Наряду с этим, первоначальное погружение в 70-96%-ный этиловый спирт на 1-2 мин, значительно повышает количество стерильных эксплантов. По данным C.L.S. Rescarolli и G.R. Zaffari использование ступенчатой стерилизации вегетативных почек этлингеры *Etlingera elatior* Jack R. M. Smith (первый этап 70%-ный этанол в течение 15 сек, второй этап 1 % NaOCl — 5 мин и 5% раствора $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ — 1 мин) позволило снизить частоту контаминации до 60% (Rescarolli, Zaffari, 2009). Аналогичные результаты по применению предварительной обработки этанолом и гипохлоритом натрия были получены у *A. purpurata* (Rout et al., 2001), *Musa sapientum* сортов Alanya 5, Anamur 10 и Bozyazi 14 (Gubbuk, Pekmezci, 2004) и *Z. officinale* сорта Wanju (Jamil et al., 2007).

Для поверхностной стерилизации исходного материала также используются ртутьсодержащие растворы (сулема и диацид). Сулема (HgCl_2), несмотря на ее токсичность для тканей, довольно часто применяется для стерилизации растительного материала семейства Zingiberales (Balachandran et al., 1990; Rout et al. 1997, 1998; Saingproa, Kanchanapoom, 1997; Borthakur et al., 1999; Khatun, 2003; Rahman et al., 2005; Srangsam, Kanchanapoom, 2007; Zhao et al., 2009; Lincy, Sasikumar, 2010) в концентрации 0,1-0,2% и с экспозицией 5-25 мин. Оптимальным стерилизующим агентом для имбиря *Z. officinale* оказалась 0,1% HgCl_2 (13 мин), что позволило снизить частоту контаминации до 3,3% (Jagadev et al., 2008). При стерилизации сегментов ложностебля костуса *Costus speciosus* (Коем. ex. retz) 0,1% раствором HgCl_2 в течение 4 минут была получена 15% частота инфицирования (Robinson et al., 2009). С. Stanly и C.L. Keng для стерилизации вегетативных почек *Curcuma zedoria* и *Zingiber zerumbet* использовали 100 мг/л HgCl_2 и 1% раствор гипохлорита натрия погружая на 10 мин, после этого на втором этапе — 0,5% раствор NaOCl с экспозицией 10 мин. Эта методика стерилизации позволила получить 80% жизнеспособных эксплантов, свободных от контаминации (Stanly, Keng, 2007).

В последнее время все более активно в питательные среды добавляют антибиотики, которые оказывают бактерицидное и фунгицидное действие (Poonsapaya, Kraisintu, 1993). Вместе с тем они также ингибируют рост и развитие эксплантов (Lima, Moraes, 2006). В исследованиях Р.Н.В. Rodrigues при использовании цефотаксима в концентрации 500 мг/л было получено 70% жизнеспособных эксплантов *Heliconia rauliniana*, свободных от контаминации (Rodrigues, 2005, 2008). Аналогичные результаты были получены при использовании цефотаксима (300 мг/л) для стерилизации вегетативных почек банана (*Musa* ААВ сорта Маса) (Carneiro et al., 2000). Вегетативные почки имбиря *Z. officinale* сорта King Yai стерилизовали 0,2% раствором тетрациклина (60 мин), 0,2% раствором метаксила (30 мин), 0,5% гипохлоритом натрия (15 мин), 0,25 гипохлоритом натрия (10 мин). При этом было получено 18% эксплантов, свободных от контаминации (Arinaitwe et al., 2000).

Наряду с ранее упоминающимися в качестве стерилизующих растворов исследователи использовали следующие антибиотики и их концентрации: 2% раствор Бавистина для вегетативных почек альпинии *Alpinia purpurata* (Garsia et al., 2006), тетрациклин и «Biocide PPM» для вегетативных почек имбиря *Zingiber montanum* Koenig (Hamirah et al., 2010), 0,3% раствор стрептомицина для *Z. officinale* сортов Suprava, Varada и Suruchi (Kambaska, Santilata, 2009; Kavyashree, 2009), 0,5 г/л хлороталонила для *Etlingera elatior* (Colombo et al., 2010), 400 мг/л ампициллина и 200 г/л гентамицина для банана *Musa sp.* сорта Kanthali (Uddin et al., 2006).

Известно, что первичные экспланты представителей Zingiberales через некоторое время после введения выделяют продукты окисления в питательную среду, что приводит к снижению их жизнеспособности. Для преодоления этого некоторые ученые перед стерилизацией опускают первичные экспланты в растворы антиоксидантов (лимонная кислота и аскорбиновая кислота) (Kalimuthu et al., 2007; Villamor, 2010). Так, по данным J. Karnataka погружение вегетативных почек *S. reginae* в раствор лимонной кислоты (150 мг/л) на 24 часа позволило получить 95% жизнеспособных эксплантов, без обработки антиоксидантом только 2,9%

(Karnataka, 2008). Аналогичные результаты были получены М. Ziv и А.Н. Halevy, которые отмечали, что погружение в раствор аскорбиновой и лимонной кислоты на 24 часа значительно уменьшало количество потемневших эксплантов и ускоряло развитие эксплантов на 2-3 дня (Ziv, Halevy, 1993). А. Muhammed и А. Quraishi для стерилизации эксплантов использовали раствор, содержащий 100 мг/л аскорбиновой и 150 мг/л лимонной кислоты (Muhammad, Quraishi, 1999).

Ряд исследователей разрабатывали методы получения асептической культуры семян гедихиума (*Hedychium spicatum* Smith). Так, D. Giri и S. Tamta использовали ступенчатую стерилизацию, погружая семена сначала в 1% раствор препарата «Bavistin» на 15 мин, затем 3 мин в 0,1% HgCl_2 (Giri, Tamta, 2011). А. Badoni и др. стерилизовали семена в 2% гипохлорите натрия в течение 5 минут (Badoni et al, 2010).

1.4. Основные факторы культивирования органов и тканей растений их влияние на морфогенетический потенциал на разных этапах размножения растений представителей порядка Имбирецветных

Важнейшую роль в регенерационной способности органов и тканей растений *in vitro* на разных этапах микроразмножения имеют ряд факторов: состав питательной среды, температура и интенсивность освещения.

Исследования показали, что микропобеги маранты *M. leuconeura* сорта Kerchoveana, которые культивировали при интенсивности освещения 2,5-5 клк, обладали высокой регенерационной способностью и формировали больше адвентивных побегов на эксплант, чем при интенсивности освещения 0,5-0,8 клк (Zhang, Dai, 1990). Р. Anasori и G. Asghari инициировали каллусообразование в основании вегетативных почек имбиря *Z. officinale* при 16-часовом фотопериоде. Затем каллус отделяли и культивировали для получения вторичных метаболитов как в условиях освещения, так и при его отсутствии. Было выявлено, что освещение стимулировало лучшее накопление гингерола и зингеберина в каллусной культуре имбиря (Anasori, Asghari, 2008).

Одним из факторов, который в значительной степени влияет на эффективность клонального микроразмножения, является состав питательной среды. В зависимости от типа экспланта и поставленных задач, на каждом этапе микроразмножения подбирается определенная питательная среда (ее химический состав и физические свойства) (Калинин и др., 1980).

Для клонального микроразмножения представителей семейства Zingiberales в качестве базовых питательных сред широко используется универсальная среда МС, В5 (Malabadi et al, 2005). Меристемы банана *Musa* sp. 'Basrai' культивировали на питательной среде МС (соли) с витаминами по В5 (Haq, Dahot, 2007). Т. Sakai и К. Imai изучали влияние питательных сред МС, ½ МС и В5 на инициацию развития меристем *Canna edulis* Ker.-Gawl. 'Green'. Среди исследуемых питательных сред на В5 была отмечена самая высокая жизнеспособность эксплантов – 92%, на среде ½ МС – 72% и на среде МС – 52% (Sakai, Imai, 2007). При этом, Т. Hosoki, Н. Sasaki культивировали продольно разрезанные верхушки побегов *C. edulis* на модифицированной питательной среде МС: макросоли по МС, микросоли и витамины по Ringe и Nitsch (Hosoki, Sasaki, 1991).

Для культивирования вегетативных почек куркумы *Curcuma haritha* М. Bejov и др. в своих исследованиях использовали питательные среды МС, Уайта (White, 1934), Нитча (Nitsch, 1964) и Митра (Mitra et al., 1976) с добавлением 1 мг/л БА и 0,5 мг/л ИУК. В результате экспериментов было определено, что оптимальной питательной средой для инициации развития эксплантов оказалась среда МС, на которой было получено 80% жизнеспособных эксплантов. Вместе с тем, при использовании питательных сред Уайта, Нитча и Митра этот показатель не превышал 35-40% (Bejov et al., 2004). G. Satheesh и др. при культивировании вегетативных почек *Costus speciosus* (Koenig) Sm. на питательных средах МС, ½ МС и ¼ МС определили, что полный состав этой питательной среды позволяет получить наибольшее количество адвентивных побегов на эксплант (Satheesh et al., 2012). Индукцию развития меристем геликонии *Heliconia bihai* сорта Lobster Claw проводили на модифицированной питательной среде, содержащей соли по МС и витамины по Морелю (Rodrigues, 2008). Сами меристемы костуса *C. speciosus*

культивировали на модифицированной среде Шенка и Хильдебранта (Chaturvedia et al., 1984).

Для микроразмножения *in vitro* чаще всего используют питательную среду, имеющую pH 5,5-5,8. Так, М.К.Н. Ebrahim и I.A. Ibrahim изучали влияние pH на процессы регенерации *in vitro* растений *M. leuconeura* сорта Kerchoviana. Исследования авторов показали, что pH 5,7 позволяет получить максимальное количество адвентивных побегов и вызывает активную дифференциацию листьев *M. leuconeura* сорта Kerchoviana, pH 6,2 – удлинение и укоренение (Ebrahim, Ibrahim, 2000). М. Bejov и др. экспериментально показано, что pH 5,5 является оптимальной для инициации развития и образования адвентивных побегов у *Curcuma haritha* (Bejov et al., 2006). Для культивирования эксплантов *C. edulis* использовали питательную среду с pH 5,6 (Hosoki, Sasaki, 1991; Sakai, Imai, 2007).

Традиционно в качестве источника углерода для культуры органов и тканей представителей семейства Zingiberales используют сахарозу в концентрации 30 г/л (Hawallan, 2000; Mahdi et al, 2010; Nkere, Mbanaso, 2010; Pandey et al., 1997; Shirani et al., 2010; Zaidan et al., 1999). Для культивирования вегетативных почек имбиря *Z. officinale* сортов Himachal local (Inden et al., 1988), Suprava, Turia local, Suruchi и V3S18 (Zheng et al, 2008), геликонии *Heliconia standleyi* Macbride (Sosa-Rodríguez et al., 2009), канны съедобной *C. edulis* (Hosoki, Sasaki, 1991) и альпинии *A. purpurata* (Illg, Faria, 1995) в питательную среду добавляли 20 г/л сахарозы, для регенерации микропобегов *M. leuconeura* сорта Kerchoviana – 40 г/л (Zhang, Dai, 1990), культивирования эксплантов *Calathea ornata* Коern. сорта Sanderiana – 45 г/л (Podwyszyska, 1997). На питательной среде МС с 30 г/л сахарозы было получено больше адвентивных побегов у *Z. zerumbet* и *C. zedoaria* (в среднем 3,2 и 3,4 побега/эксплант соответственно) по сравнению с добавлением 15 г/л (в среднем 1,7 и 2,6 побега/эксплант соответственно) (Stanly et al., 2010). Вместе с тем, среди используемых концентраций сахарозы (30, 60, 90 г/л) при культивировании этлингеры (*E. elatior*) оптимальной для развития эксплантов оказалась 30 г/л. Повышение концентрации сахарозы до 90 г/л приводило к потемнению эксплантов (Arunyart, 1994). Имеются ряд публикаций, в которых указывается, что в качестве

источника углерода для культивирования эксплантов используют также глюкозу (Gabryszewska, 2010). Однако, по данным R.A. Shibli и M.M. Ajlouni при использовании 20 мг/л сахарозы было получено максимальное количество соматических эмбриоидов у имбиря *Iris nigricans*, по сравнению с аналогичной концентрацией глюкозы или фруктозы (Shibli, Ajloun, 2000).

Определяющим фактором индукции этапов морфогенеза является консистенция питательной среды. В качестве желирующего вещества в твёрдых питательных средах используют агар-агар (Бутенко, 1964; Калинин и др., 1980). Результаты исследований показали, что при культивировании меристем геликонии *H. standleyi* на жидкой питательной среде микропобеги активно вытягивались по сравнению с использованием аналогичной, но с добавлением агара (Sosa-Rodríguez et al., 2009). На твердой среде МС с 2 мг/л БА наблюдали более активный рост меристем *Z. officinale*, чем на жидкой (Adaniya, Shira, 2001). Для культивирования вегетативных почек *C. haritha* использовали разные концентрации агара в питательной среде. Так, применение 4 г/л агара способствовало значительному удлинению микропобегов, но снижению адвентивного побегообразования, 7 г/л – образованию большего количества микропобегов и корней на эксплант, 10 г/л подавляло рост и образование новых микропобегов (Badoni et al., 2010). Меристемы канны *Canna indica* развивались лучше на жидкой питательной среде ½ МС, чем на аналогичной агаризованной среде (Kromer, 1979).

Важным фактором, регулирующим морфогенетические реакции изолированных органов и тканей растений, является наличие в питательной среде регуляторов роста – ауксинов, цитокининов, гиббереллинов и др. В зависимости от типа экспланта и этапа микроразмножения подбираются их оптимальные комбинации и концентрации (Муромцев и др., 1987; Гамбург и др., 1990; Кунах, 2005).

К группе веществ цитокининового типа действия относят: кинетин, БАП, БА, ТДЗ, 2ip, зеатин и др. Местом синтеза цитокининов в растении являются корни. Из корней в результате транспирации эти вещества переносятся вверх по стеблю. Цитокинины снимают апикальное доминирование, выводят органы из состояния

покоя, индуцируют развитие пазушных почек. Кроме того, они играют важную роль в процессе дифференцировки, приводящей к делению и формированию каллусной ткани (Катаева, Бутенко, 1983).

Группа ауксинового типа действия включает ИУК, ИМК, НУК и 2,4-Д. Ауксины в основном синтезируются в апикальной меристеме стебля и в некоторых случаях в растущих меристемах корня, зародыша, семяпочек, в листьях и семядолях. Ауксины влияют на растяжение клеток, деление и дифференцировку. Основной его ролью при клональном микроразмножении является индукция образования корней и регенерация побега из каллуса, сформировавшегося на экспланте (Кефели, 1985; Калинин и др, 1992).

Чаще всего на этапе собственно микроразмножения используют цитокинин БАП. Так, этот регулятор роста использовался в концентрациях 3-5 мг/л при культивировании вегетативных почек *Zingiber rubens* Roxb. (Mohanty et al., 2011), *Z. officinale* (Palai et al., 2000), банана *Musa sapientum* (Rahman et al, 2004; Youmbi, Ngha, 2004), *Maranta arundinacea* (Daquinta et al., 2009).

Для адвентивного побегообразования из культуры меристем банана *M. sapientum* БАП был эффективнее, чем кинетин. Вместе с тем, при использовании кинетина исследователи отмечали активный рост корней (Wong, 1985). Лучшие результаты по микроразмножению *Z. officinale* были получены на среде МС с добавлением 2 мг/л БАП – в среднем 5,1 побегов/эксплант (Rajani, Patil, 2009).

Исследования R. Hartati и др. показали, что культивирование вегетативных почек *M. arundinacea* на твердой питательной среде МС с добавлением 2 мг/л БАП и 0,5 мг/л НУК позволило получить 1,6 адвентивных побегов на эксплант. Вместе с тем, добавление в питательную среду 1 мг/л НУК способствовало активному росту эксплантов (Hartati et al., 2000).

В научной литературе имеются отдельные сообщения о совместном применении БАП и кинетина (Venkatachalam et al., 2007). Так, на 45-е сут культивирования меристем банана *M. sapientum* ‘Ануром’ на питательной среде МС, содержащей по 5 мг/л БАП и кинетина и 150 мл кокосовой воды было получено в среднем 5,8 побега/эксплант. При этом использование каждого из

цитокининов в отдельности значительно снижало коэффициент размножения (Rahman et al, 2005). Наибольшее количество побегов на эксплант у калатеи *Calathea ornata* Koern. 'Sanderiana' было получено на питательной среде МС при совместном использовании 2,5 мг/л БАП и 2,5 мг/л кинетина (Podwyszyska, 1997). При культивировании альпинии *Alpinia purpurata* на МС с добавлением 3,0 мг/л ВА и 2,0 мг/л кинетина отметили образование $6,4 \pm 0,32$ побега/эксплант и 80% частоту адвентивного побегообразования. Вместе с тем, у части микропобегов наблюдали спонтанное корнеобразование на 15 сут культивирования (Kochuthressia et al., 2010).

Для инициации развития вегетативных почек и микроразмножения калатеи *Calathea leopardina*, *Calathea roseopicta* (Zhang et al., 2007, 2008), *Calathea rotundifolia* сорта Fasciata (Yin et al, 2009), альпинии *Alpinia zerumbet* сорта Variegata (Chen et al, 2009), использовали питательные среды МС и $\frac{1}{2}$ МС с добавлением 2-10 мг/л БА.

Для некоторых представителей порядка Zingiberales высоко эффективным для адвентивного побегообразования оказалось добавление в питательные среды в качестве цитокинина ТДЗ (Roy et al., 2010). Тидиазурон – это регулятор роста, который часто используется в низких концентрациях и обеспечивает высокую частоту адвентивного побегообразования. Однако высокие дозы ТДЗ замедляют процесс удлинения микропобегов и вызывают активное каллусообразование (Rungjindamai et al, 2010). Питательная среда МС с добавлением 0,5 мг/л ТДЗ и 2 мг/л ИУК была оптимальной для микроразмножения *in vitro* банана сортов Cavendish Dwaft и Valery (25 побегов/эксплант за 120 сут). Вместе с тем, при использовании БАП снижался коэффициент размножения, и исследователи отмечали более активный рост микропобегов (Farahani, et al, 2008).

Результаты экспериментов показали, что ТДЗ может накапливаться в эксплантах и, таким образом, индуцирует образование адвентивных микропобегов при дальнейшем культивировании на безгормональной среде МС (Makara et al., 2003; 2010).

Для размножения гедихиума (*Hedychium spicatum* Smith) A. Giri и S. Tamta проводили сравнительный анализ действия трех веществ цитокининного типа действия: кинетин, БА и ТДЗ. На 30-е сут культивирования было получено наибольшее количество адвентивных побегов на эксплант (3,86 шт.) при добавлении в питательную среду МС 0,21 мг/л ТДЗ. Вместе с тем, 83% культивируемых микропобегов образовали дополнительные побеги. При использовании кинетина (0,22 мг/л) адвентивные побеги имели большую длину (4,94 см) по сравнению с другими применяемыми цитокининами (до 3,92 см). БА в концентрации 0,23 мг/л снижал коэффициент размножения гедихиума до 1,73 и частоту адвентивного побегообразования до 53,33% (Giri, Tamta, 2010).

К. Kromer для культивирования вегетативных почек канны *Canna indica* L. использовал питательную среду МС с добавлением ИУК, ИМК и 2,4-Д, а также кинетина. Оптимальной средой для адвентивного побегообразования и удлинения микропобегов оказался вариант среды, дополненный 2 мг/л ИУК и 1 мг/л кинетина. Вместе с тем, на безгормональной МС автор не отмечал регенерации микропобегов (Kromer, 1979).

Для индукции корнеобразования микропобегов представителей Zingiberales и других корневищных культур в условиях *in vitro* в питательную среду чаще всего добавляют вещества ауксинового типа действия: ИМК, ИУК и НУК как в отдельности, так и в разных сочетаниях (Гамбург и др., 1990; Калинин и др, 1992, Hosoki et al., 1989; Bouza et al., 1992, 1994). При этом нередко используют среды, содержащие ½ минеральных солей по МС (Eslani, Khoushkhoy, 2003; Zhang et al., 2008; Bakrudeen, Arun, 2009). Наиболее эффективной для укоренения микропобегов *Hedychium spicatum* была ИМК в концентрации 0,5 мг/л. При данной концентрации, частота укоренения микропобегов составила 96,29%, по сравнению с остальными – до 85,17% (контроль безгормональная среда 29,62%). Вместе с тем, ИМК стимулировала получение максимального количества корней на эксплант (Giri, Tamta, 2010).

Как показали результаты экспериментов по подбору ауксинов на этапе ризогенеза микропобегов *Alpinia officinarum* Hance использование ИМК

способствовало активному корнеобразованию по сравнению с ИУК и НУК (Selvakkumar et al. 2007). Р. N. Jagadev и др. определена оптимальная питательная среда для укоренения микропобегов *Z. officinale* которая была дополнена 0,5 мг/л НУК. Через 10 сут. отмечали образование в среднем 13,3 корней/эксплант длиной до 2,0 см (Jagadev et al., 2008).

У такого растения как *Hedychium roxburghii* Blume микропобеги укореняли на среде МС с 0,2 мг/л НУК (Tripathi, Billaton, 1985). Культивирование микропобегов *Calathea leopardina* на среде $\frac{1}{2}$ МС с 1,0 мг/л НУК позволило достичь 92,9% частоту ризогенеза (Zhang et al., 2007). Вместе с тем, на $\frac{1}{2}$ МС, дополненной 0,1 мг/л НУК и 0,1 мг/л ИМК было получено 96% укоренившихся микропобегов *Alpinia zerumbet* сорта Variegata (Chen et al., 2009). Т. Hosoki др. получили 100% частоту укоренения микропобегов канны на питательной среде МС с 0,1 мг/л ИМК (Hosoki, Sasaki, 1991).

1.5. Особенности проращивания семян *in vitro* и эмбриокультура

Характерной особенностью семян представителей Имбирецветных является твердая оболочка, длительный, неравномерный период прорастания. Для ускорения появления всходов используют предпосевную стратификацию и скарификацию семян (Neil, 2005; Mishra et al., 2015).

Имеется ряд сообщений, касающихся изучения всхожести семян канны при условии их предпосевной обработки. Н.Г. Чемарин и А.Н. Глазурина изучали влияние стратификации (обработка кипятком в течение 20, 30 и 40 сек и облучение семян дозами 0,1-500 кр на установке ГУП-Со-50) и скарификации на прорастание семян канны сорта Надежда (на 10 сут культивирования). Высокая всхожесть семян канны была получена только при механическом нарушении кожуры семени (Чемарин, Глазурина, 1970). По данным З.А. Аствацатряна и Дж.А. Овнаняна обработка семян канны сорта Milland кипятком повышала их всхожесть до 48%, надпиливание кожуры – до 42%, а у сорта Robert Wallace – соответственно до 4 и 12% (Аствацатрян, Овнанян, 1977). С. Ляшенко и К. Андон изучали влияние

различных приемов обработки семян канны садовой на их всхожесть и энергию прорастания. При термической обработке семена сначала выдерживали при температуре +4°C в течении 2 ч, а затем кипятили в течении 1-3 или 5 мин или отпаривали 10-20 сек. Всходы появились только в варианте с отпариванием на 14 сут после посева, другие варианты и контроль (без обработки) всходов не дали. Химическая обработка предусматривала погружение семян в концентрированную серную кислоту на 1, 15, 20, 30, 60, 120 или 150 мин с последующей их промывкой в проточной воде. Первые 3 варианта дали самую низкую всхожесть (до 30%) в варианте 120 и 150 мин всхожесть была самой высокой – 40% (Ляшенко, Андон, 1981). A.N.V.W. Cruz и др. в своих исследованиях отметили, что семена *Canna warszevicii* обладают очень низкой всхожестью, обусловленной твердостью тегумента. Скарификация семян в зоне микропиле индуцировала прорастание через 12-24 ч. Таким образом, на 4-е сут всхожесть составила 95-100% (Cruz et al., 1991).

A.S. Garsia и др. семена стрелиции *Strelitzia reginae* перед высадкой погружали в раствор Stimulate (Stoller do Brasil Ltd.), содержащий 90 мг/л кинетина, 50 мг/л ГК₃ и 50 мг/л ИМК. При этом использовали следующие концентрации раствора: 20 мл/л, 40 мл/л, 80 мл/л, 160 мл/л, 320 мл/л. Исследования показали, что выдерживание семян в растворе Stimulate позволило увеличить частоту прорастания семян в 2-3 раза, в зависимости от применяемой экспозиции (Garsia et al., 2006).

Исследования ряда биотехнологов из зарубежных стран показали, что достойной альтернативой семенному размножению и черенкованию может стать размножение с использованием методов культуры органов и тканей. A. Badoni и др. проращивали семена гедихиума (*Hedychium spicatum* Smith) на питательной среде, содержащей агар и сахарозу (Badoni et al., 2010). G. Giri и др. для индукции прорастания семян *H. spicatum* просушивали их в течение 3 сут при комнатной температуре и стратифицировали при +4°C в темноте в течение 65 сут. Затем стерилизовали и помещали на питательную среду МС с 8 мг/л агара. Через 3 недели после введения эксплантов в условия *in vitro* образовавшиеся проростки размером 1,5 см перемещали на питательную среду для размножения (Giri, Tamta, 2011). В

исследованиях Ch. Gao показано, что для прорастания семян китайского травянистого пиона необходимо добавление в питательную среду МС 1 мг/л БА и 1 мг/л ГК₃ (Gao, 2009, 2010).

S.C. Joshi и S.C. Pant получили асептические сеянцы *Canna indica* L. подвергая семена химической скарификации серной кислотой (Joshi, Pant, 2010). Аналогичные исследования были проведены S.N. Wafa и др. Так, семена *C. indica* сначала замачивали в дистиллированной воде на сутки. Затем семена погружали в 100% раствор серной кислоты (H₂SO₄) в течение 3-х часов, промывали несколько раз и снова замачивали в дистиллированной воде в течение суток. Перед посевом семян на безгормональную среду МС их стерилизовали в растворе 70% этилового спирта в течение 2 мин с последующим повторным промыванием стерильной дистиллированной водой (Wafa et al, 2015).

В настоящее время культура изолированных зародышей является одним из методов, позволяющих получать ценные растения из недоразвитых или незрелых зародышей, что может быть результатом неблагоприятных внешних условий культивирования, самоопыления и несовместимости видов и сортов (Митрофанова, 1994а, б; Митрофанова и др., 2000, 2014; Roy, Pal, 1991; Mishra et al., 2015). Так, для индукции прорастания изолированных зародышей гедихиума (*Hedychium forrestii*) экспланты помещали на питательную среду МС с добавлением 1 мг/л БА и 0,2 мг/л НУК (Xiong et al., 2005). Культивирование изолированных зародышей двух видов геликонии *Heliconia rostrata* и *H. bihai* на питательной среде МС с добавлением 0,25 г/л активированного угля, позволило получить 100% частоту прорастания изолированных зародышей. Вместе с тем, культивирование эксплантов на среде с БАП + ГК₃ индуцировало калусообразование (Souza et al., 2010).

Исследования А.М.А. Fernández показали, что изолированные зародыши стрелиции (*Strelitzia reginae*) прорастали на питательной среде White через 7 сут. Затем для ускорения роста проростков их переносили на питательную среду МС с добавлением НУК и кокосового молока. При культивировании на питательной среде Шенка и Хильдебранта с добавлением НУК и БА отметили образование каллуса (Fernandez et al, 2008).

Результаты J.J. North и др. показали позитивное влияние 0,2 г/л активированного угля на уменьшение потемнения эксплантов *S. reginae* вследствие образования фенольных соединений (North et al., 2011). По исследованиям P.D. Oliveira Paiva и др. при культивировании изолированных зародышей стрелиции определили оптимальную концентрацию сахарозы – 20,4 мг/л. Вместе с тем, добавление в среду БАП снижало рост проростков (Oliveira Paiva et al., 2004).

Изолированные зародыши банана сортов Calcutta и Malaccensis (*Musa acuminate*-AA), Butuhan и Franza (*M. balbisiana*-BB) и гибриды 0304-02, 1304-06, 4252-04 и 9379-09 (*M. acuminata*-AA) после поверхностной стерилизации помещали на 40 сут в чашки Петри, содержащие питательную среду МС с 30 г/л сахарозы, затем в пробирки на 45 сут (Neves et al., 2002).

Имеются сообщения, касающиеся изучения оптимального состава питательных сред для прорастания зиготического зародыша пиона. Ch. Gao было отмечено, что при увеличении концентрации БА в питательной среде МС происходит разрастание семядоли *Paeonia suffruticosa*, что подавляет рост корешка. Вместе с тем, питательная среда с НУК индуцирует каллусообразование и подавляет корнеобразование. Для роста гипокотилия, корней и образования полноценных проростков использовали питательную среду МС с добавлением 0,2 мг/л БА (Gao, 2009). По данным W. Jia и H. Liu для прорастания зрелого зародыша и на этапе собственно микроразмножения пиона сорта Fengdan необходимо добавление в питательную среду МС 2,5 мг/л БА и 0,2 мг/л НУК. Вместе с тем, культивирование на питательной среде ½ МС с 1,5 мг/л ИМК и 0,5 мг/л НУК способствовало повышению частоты корнеобразования до 60,17% (Jia, Liu, 2009).

1.6. Реализация морфогенеза растений *in vitro* через соматический эмбриогенез

Одним из методов клонального микроразмножения является соматический эмбриогенез, который основан на индукции образования зародышеподобных структур из генеративных или соматических тканей растений путем, сходным с

зиготическим эмбриогенезом. Соматический эмбриогенез может проходить прямым и косвенным путем (Митрофанова, 2011). Для представителей порядка Zingiberales и других корневищных декоративных и плодовых культур характерным является непрямой соматический эмбриогенез.

Каллусообразование гедихиума (*Hedychium muluense* R.M. Smith) индуцировали на питательной среде МС с добавлением 2 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л кинетина. Рыхлый каллус переносили на жидкую среду (макро- и микроэлементы по МС, витамины по Гамборгу), дополненную 0,13 мг/л ТДЗ и 2 мг/л БАП. Через четыре недели культивирования на шейкере исследователи наблюдали образование соматических зародышей. После многократного культивирования было получено в среднем 130 соматических зародышей/эксплант, из которых 50% регенерировало в полноценные растения (Sakhanokho et al., 2008).

Проводились исследования по индукции соматического эмбриогенеза *in vitro* из сегментов семядоли стрелиции (*Strelitzia reginae*). Через 5 месяцев культивирования на питательной среде МС с добавлением 0,5-2,0 мг/л 2,4-Д, 30 г/л сахарозы, 0,1 г/л активированного угля отмечали образование проэмбриогенных структур. При последующем культивировании наблюдали дальнейшее развитие эмбриогенных структур размером 5-6 мм. Однако дальнейшего формирования соматических зародышей не отмечали (Promtep, 1981). Н. Schoofs и др. индуцировали появление соматических эмбриоидов из меристем банана на жидкой среде с 22,7 мг/л БАП. При этом частота соматического эмбриогенеза составила от 15 до 80% в зависимости от генотипа (Schoofs et al., 1998).

При культивировании тонких срезов меристем банана (*Musa*, АВВ, сорта Bluggoe) на питательной среде МС с 0,25 мг/л 2,4-Д формировался каллус. При длительном культивировании на поверхности каллуса образовывались проэмбриогенные зоны. При пассаже на жидкую среду с 0,02 мг/л НУК и 0,25-2,5 мг/л БА были получены биполярные эмбриоиды. Вместе с тем, при гистологическом сравнении соматический зародыш имел сходное строение с зиготическим зародышем представителей *Musa* sp. (Banerjee et al., 1987).

Исследования испанских ученых показали, что культивирование вегетативных почек банана на питательной среде $\frac{1}{2}$ МС с добавлением 25 мг/л БА и 0,217 мг/л ИУК способствовало образованию каллуса. Отделение и дальнейшее культивирование каллуса в течение 100 сут на твердой питательной среде МС с добавлением 1 мг/л 2,4-Д и 0,219 мг/л зеатина авторами индуцировало образование первичных эмбриоидов. Дальнейшее культивирование эмбриогенных клеток на шейкере на питательной среде без регуляторов роста вызывало образование зрелых соматических зародышей, которые регенерировали в полноценные растения на твердой питательной среде с добавлением 0,2 мг/л БА (Ramirez-Villalobos, Garcia, 2009).

L.S. Morais-Lino и др. использовали сегменты мужских незрелых цветков банана сорта Maranhgo, ААВ для получения суспензионной культуры и дальнейшей регенерации растений через соматический эмбриогенез. Была определена оптимальная питательная среда для этапа регенерации микропобегов из клеточной суспензии – МС с 2 мг/л ИУК и 0,5 мг/л БАП (Morais-Lino et al., 2008).

Успешным оказалось получение эмбриогенного каллуса *Zingiber zerumbet* в темноте на среде МС с 1 мг/л биотина, 1 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л ИУК и 1 мг/л НУК. Регенерацию соматических зародышей отмечали на безгормональной среде МС в отсутствии освещения. Для размножения растений экспланты помещали на среду с БАП и в условия освещения (Idris et al., 2009).

А. Каскар и др. индуцировали образование эмбриогенного каллуса из сегментов листьев, отобранных от растений, культивируемых *in vitro*. В результате исследования ученых было выявлено, что из используемых ауксинов (ИМК, НУК и 2,4-Д) оптимальным оказалось применение 2,4-Д в концентрации 0,6 мг/л. Для регенерации растений из эмбриогенного каллуса использовали питательную среду МС с 2 мг/л БА. Гистологические исследования показали различия эмбриоидов на разных стадиях развития (Kaskar et al., 1993).

Активное образование соматических эмбриоидов в каллусной культуре ириса *Iris nigricans* ученые отметили на питательной среде, содержащей 1 мг/л БА (Shibli, Ajlouni, 2000).

1.7. Условия депонирования растений

Основными способами сохранения растений в условиях *in vitro* являются хранение при остановке роста (криоконсервация) и депонирование биологических объектов, замедляя процессы их роста (растущие коллекции *in vitro*) (Reed, Chang, 1997; Reyes et al., 1998; Oliveira et al., 2000; Lambardi et al., 2001; Dunaeva et al., 2002; Kaviani, 2011; Kovalchuk et al., 2014; 2015).

Успешное хранение в культуре *in vitro* растений определяется многими факторами, из которых влияние температуры является наиболее изученным. Так, в качестве фактора, замедляющего рост растений, может выступать пониженная температура в интервале от -1°C до $+8^{\circ}\text{C}$. Так, экспланты тропических растений при культивировании *in vitro* при температуре от -1°C до $+8^{\circ}\text{C}$ погибают, поэтому для поддержания жизнеспособности этих культур используют температуру в интервале от $+14^{\circ}\text{C}$ до $+18^{\circ}\text{C}$ (Rao Ramanatha, Rile Kenneth, 1994).

Л.С. Самарина в своих исследованиях определила оптимальный тип эксплантов: микропобегов от микропрививки, семян и микропобегов от взрослых растений-доноров лимона Новоафонский. Через 4 месяца культивирования в условиях пониженного светового и температурного режима (1 клк и $+10\pm 2^{\circ}\text{C}$) наименьший прирост автором был отмечен у семян и у микропривитых растений (от 0 до 4,3 мм). Вместе с тем, при стандартных условиях культивирования (5 клк и $+22\pm 2^{\circ}\text{C}$) прирост составил 12-14,8 мм. (Самарина, 2010). Вместе с тем, по данным Н.А. Вечерниной условия замедленного роста позволяют сохранить экспланты *Fritillaria* (*F. meleagris* и *F. verticillata*), *Hemerocallis* сорта Алан, *Iris sibirica*, *Prímula* (*P. polyantha* и *P. prugonicenses*) в течение 18 месяцев (Вечернина, 2006). Исследования И.С.Саматовой показывают, что при депонировании в условиях пониженной температуры ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) в течение 12 месяцев жизнеспособность эксплантов земляники составила 96%, у ежевики – 98 %, у малины – 83%. Наряду с этим, через 20 месяцев культивирования количество жизнеспособных эксплантов в среднем составило 52% (Саматова, 2009).

Для замедления роста растений в культуре *in vitro* некоторые исследователи добавляют в состав питательной среды различные осмотики (сорбит, маннит, сахароза) и ретарданты (абсцизовая кислота (АБК), хлорхолинхлорид (ССС)) (Высоцкая, 1994), сокращают фотопериод (Reed, 1999), или хранят образцы в полиэтиленовых запаянных пакетах вместо стеклянных пробирок (Reed, 1999). К снижению скорости роста пробирочных растений приводит также их хранение в условиях низкого парциального давления кислорода (Brindgen, Staby, 1981) или под слоем минерального масла (Calpin, 1959).

Чаще всего для замедления роста эксплантов в качестве осмотика используют сахарозу. Повышение ее концентрации до 40-60 г/л в питательной среде задерживает рост клеток, не вызывая токсического эффекта и позволяет поддерживать культуры в состоянии покоя в течение длительного периода. Кроме того, высокий уровень сахарозы обеспечивает растительным клеткам возможность без повреждения переносить температуру ниже 0°C (Reed, 1999). Н. Lata и др. в качестве осмотиков для депонирования вегетативных почек *Cannabis sativa* L. использовали маннитол и сорбитол (0,2-0,4 г/л каждого индивидуально и в комбинации). В результате исследований авторами были определены оптимальные концентрации осмотических агентов (по 0,2 г/л каждого) (Lata et al., 2012).

В.М. Reed, Y. Chang проводили исследования по сохранению *in vitro* образцов представителей *Ribes* в генбанке США. Хранение эксплантов осуществлялось в газопроницаемых полиэтиленовых пакетиках при температуре +4°C и -1°C в темноте более 2,5 лет. Вместе с тем учеными были разработаны методы сохранения эксплантов актинидии, смородины, земляники, груши, яблони, сливы и др. культур путем криосохранения и в виде медленнорастущей коллекции *in vitro* (Reed, Chang, 1997).

В процессе исследований О.И. Молкановой и др. установлены оптимальные концентрации осмотиков и ретардантов в питательной среде и показатели интенсивности освещения и температурного режима, необходимые для культивирования регенерантов семейства *Oleaceae*, *Actinidiaceae*, *Ericaceae* на протяжении 12-18 месяцев, а для семейства *Liliaceae* до 24 месяцев

безпересадочного культивирования. Оптимальными условиями сохранения для растений-регенерантов авторами выявлены пониженная температура (+3-+7°C), слабая освещенность (1,2-2,5 клк) и ½ МС. Для представителей семейств *Rosaceae*, *Oleaceae* эффективно добавление в состав питательной среды 40 г/л сахарозы и 8 г/л маннита, для *Liliaceae* – 20 г/л сахарозы и 5-7 мг/л АБК (Молканова и др., 2010).

G. Toshinari и M. Masahiro для депонирования каллусной культуры *Lilium formosanum* сорта Pricei, *Lilium lancifolium* сорта Flaviflorum, *Lilium leucanthum* сорта Centifolium, *Lilium monadelphum* и *Lilium wallichianum* использовали безгормональную питательную среду МС с 1 мг/л пиклорам (4-Амино-3,5,6-трихлорпиридинкарбоновая-2 кислота). Вместе с тем, колбы с эксплантами помещали в условия пониженной температуры (+5°C) (Toshinari, Masahiro, 2010).

Исследования S.R. Bhatt и K.P.S. Chandel показали, что культивирование при низкой температуре (+15°C) позволяет сохранить жизнеспособность эксплантов в течение 20-22 месяцев, по сравнению с культивированием в стандартных условиях (+25°C). Вместе с тем, при добавлении в питательную среду маннитола (0,2-0,4 г/л) авторами было выявлено, что длительность депонирования увеличивается на 2-3 месяца. Применение высоких концентраций маннитола вызывает постепенное отмирание эксплантов (Bhatt, Chandel, 1993).

Исследования Н.С. Рыжковой показали, что после длительного хранения *in vitro* в условиях пониженных положительных температур растения земляники (*Fragaria ananassa* Duch.) (12 лет) не утрачивают способности к пролиферации, ризогенезу, адаптации *in vivo*, а также цветению и образованию плодов при выращивании в полевых условиях. Практически у всех изученных сортов на этапе адаптации отмечаются определенные аномалии: белая штриховатость, аномальная морфология листьев, многоверхушечность, пестролистность и хлороз листьев (Рыжкова, 2005).

Криоконсервация – метод, который дает возможность длительно сохранять живой материал при низких температурах, что может осуществляться несколькими способами: путем замораживания при температуре около -20°C; при температуре

около -79°C в твердом CO_2 ; в низкотемпературных холодильниках (-80°C); в жидком азоте при -196°C .

Количество публикаций, касающихся применения метода криосохранения для сохранения растительного материала значительно превышает количество публикаций о создании медленнорастущих коллекций *in vitro* (Попова и др., 2013; Malaurie, 2001; Lambardi et al., 2001; Häggman et al., 2001; Panis et al., 2001; Cruz-Cruz et al., 2013). Исследования ряда зарубежных ученых касались применения метода криосохранения для депонирования *Carica papaya* (Ashmore et al., 2001); *Olea europaea* L. (Benelli et al., 2001); *Dioscorea* spp. (Malaurie et al., 2001) *Alpinia nigra* (Gaertn.) Burt (Rungjindamai et al., 2010).

Вместе с тем, имеется немало литературных источников, в которых описывается успешное применение метода капсулирования-дегидратации для длительного сохранения соматических зародышей (Rao, Bapat, 1993; Gonzalez-Arnao et al., 2003; Corredoira et al., 2004). Н. Lata и др. использовали капсулирование вегетативных почек *Cannabis sativa* L. в высоко-концентрированном растворе альгината натрия (230 μM) с добавлением 50 μM хлорида кальция и культивировали при $+5$, $+15$ и $+25^{\circ}\text{C}$. Исследования ученых показали, что оптимальная температура, при которой максимально сохранялась жизнеспособность эксплантов (60%) – $+25^{\circ}\text{C}$ (Lata et al., 2012).

1.8. Условия адаптации растений, полученных *in vitro*

Адаптация – один из важных этапов клонального микроразмножения, поскольку при переносе регенерантов в условия *in vivo* они подвергаются сильному стрессу в результате смены контролируемых условий культивирования (постоянные влажность, температура, фотопериод, асептика) на естественные. Успешное развитие регенерантов *in vivo* зависит от следующих факторов: сроки высадки в нестерильные условия, температура, интенсивность освещения и влажность воздуха в помещении, компонентный состав субстрата (Трушечкин и др., 1988; Cha-um et al., 2005; Barra, Mogollón, 2007; Assis et al, 2009).

В качестве субстрата для адаптации пробирочных растений используют смеси стерильного почвенного субстрата, перегноя, торфа, песка, перлита, вермикулита в разных соотношениях. Так, регенеранты *Zingiber officinale* успешно адаптировали в субстрате из песка, почвы и перегноя (1:1:1) (Sharma, Singh, 1997), регенеранты *Maranta arundinacea* и *M. leuconeura* сорта Erythroneur в вермикулите (Simin, 1996), *M. leuconeura* сорта Kerchoveana в вермикулите и почве (1:1) (Zhang, C.T.W. Dai, 1990), *Alpinia purpurata* в субстрате из почвы и вермикулита (1:1) (Illg, Faria, 1995), *Alpinia officinarum* Hance в смеси из песка и опилок (Arunyanart, 1994; Arannat, 1994), *Hedychium forrestii* в субстрате из торфа и перлита (Xiong, 2005).

Регенеранты *Maranta arundinacea* адаптировали в цеолите и тростниковом субстрате 1:1. Исследователи отмечали 90% приживаемость к условиям *in vivo* (Daquinta et al., 2009). Для адаптации гедихиума в качестве субстрата применяли смесь песка, почвы и вермикулита. Приживаемость укорененных растений составила 40-50% (Badoni et al., 2010). Для адаптации банана *Rathambala* (Musa AAA) использовали смесь почвы:коровий навоз:песок (1:1:1). Приживаемость через 3 месяца культивирования *in vivo* составила 75% (Abeyarathe, 2002). Успешной была адаптация регенерантов банана сорта BARI-1, где в качестве субстрата использовали смесь почвы и гумуса (98% приживаемость) (Azam et al., 2010). Для адаптации имбиря использовали смесь почвы и песка (1:1). Приживаемость составила 94% (Bhattacharya, Sen, 2006). Высокий процент прижившихся растений (80%) отмечали у имбиря сорта Maran в почве (Nirmal Babu et al., 1992).

Некоторые исследователи используют для адаптации пробирочных растений кокосовое волокно. Так, А. М. Assis и др. выбрали для этлингеры *Etlingera elatior* оптимальный субстрат, содержащий песок и кокосовую стружку (Assis et al., 2009). Ученые получили 83% адаптированных регенерантов этлингеры *Etlingera hemisphaerica* сорта Red Tulip при высаживании в субстрат, содержащий 25% торфа и 15% перлита и 60% кокосового волокна (Barra, Mogollón, 2007).

Для высадки в условия *in vivo* используют растения, имеющие хорошо развитую корневую систему и 2-3 развернутых листа. Кроме того, приживаемость зависит от высоты высаженных регенерантов. Так, на адаптацию *in vivo*

пересаживали растения геликонии *Heliconia standley* Macbride, достигающие 3-5 см. Приживаемость высаженных растений длиной 5 см и более составила в среднем 99,4% на 45 сут культивирования, длиной 3 см – 76,6% (Sosa-Rodríguez et al., 2009).

Некоторые исследователи применяли для адаптации последовательное чередование нескольких видов субстрата (Kanchanapoom, Promsorn, 2011). Так, пробирочные растения *Z. officinale* сортов Suprava и Suruchi сначала высаживали в вермикулит на 3 недели, затем пересаживали в смесь почвы, песка и перегноя (1:1:1) (Kambaska, Santilata, 2009). Укорененные растения банана 2 генотипов Sannachenkadali, AA и Red banana, AAA высаживали в вермикулит на 10 сут, затем пересаживали на 14 сут в компостную землю. При этом, приживаемость регенерантов составила 100% (Resmi, Nair, 2007).

Высокая приживаемость регенерантов маранты к условиям *in vivo* была получена при применении смеси песка и почвы с добавлением Rootone F (Bayer CropScience LP) (Priadi et al., 2000). P.H.V. Rodrigues и др. выявили, что адаптация растений геликонии *Heliconia bihai* в условиях затенения значительно лучше, чем в условиях солнечного освещения (Rodrigues et al., 2005).

Перед высадкой в условия *in vivo* некоторые исследователи погружают корни растений в растворы, содержащие фунгициды. Так, К.Р. Kochuthressia и др. применяли 1% раствор Bavistin с экспозицией 5 мин. Затем в качестве субстрата для *Alpinia purpurata* использовали смесь вермикулита и почвы (1:1). Растения подкармливали раствором среды ½ МС. При этом, отметили 100% приживаемость растений альпинии к условиям *in vivo* (Kochuthressia et al., 2010). S.M. Balashandran и др. погружали регенеранты *Curcuma spp.* и *Zingiber officinale* в 0,2% раствор фунгицида Bavistin на 15-20 мин. В качестве субстрата для адаптации использовали песок:почва (1:1) (Balashandran, 1990).

Подводя итоги анализа литературных данных отечественных и зарубежных авторов следует отметить, что работы, раскрывающие биотехнологические приемы клонального микроразмножения канны садовой и депонирования в виде медленнорастущей коллекции *in vitro*, представлены в виде единичных публикаций. Этот факт объясняется, прежде всего, высокой частотой контаминации

эксплантов (как экзогенной, так и эндогенной, которая нередко проявляется при длительном культивировании). Существующее многообразие сортов канны садовой, которые значительно различаются между собой по способности к морфогенезу *in vitro*, доказывает необходимость индивидуального подхода к изучению каждого объекта. Поэтому подбор состава питательных сред и условий культивирования производится опытным путём для каждого генотипа. Биотехнологические исследования зарубежных исследователей по канне касались в основном разработки и совершенствования отдельных этапов клонального микроразмножения *Canna indica* L., *Canna*×*generalis* и *Canna edulis* Ker. Вместе с тем, по *Canna*×*hybrida hort. ex* Backer не имеется литературных источников, которые касались бы условий прорастания семян *in vitro* и изолированных зародышей, что позволило бы использовать их в селекционных исследованиях. Наряду с этим, по данным, представленным в литературе, очень сложно спрогнозировать конечный выход регенерантов при использовании различных способов микроразмножения. В связи с этим актуальным является изучение морфогенетического потенциала различных эксплантов канны садовой, закономерностей их развития на различных этапах клонального микроразмножения; выявление основных факторов, влияющих на процесс морфогенеза; разработать схему микроразмножения растений и создания медленнорастущей коллекции *in vitro* этой декоративной культуры.

РАЗДЕЛ 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Представленные в диссертационной работе исследования являются составной частью тематического плана научно-исследовательских работ Государственного бюджетного учреждения Республики Крым «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр».

Экспериментальная часть исследований по культуре органов и тканей канна садовой выполнена на базе лаборатории биотехнологии и вирусологии растений отдела биологии развития растений, биотехнологии и биобезопасности Никитского ботанического сада – Национального научного центра в период с 2011 по 2014 гг.

Исходный растительный материал: краткая ботаническая характеристика канна садовой (*Canna × hybrida hort. ex Backer*), ее народнохозяйственное значение и характеристика вводимых в условия *in vitro* сортов. Канна садовая (*Canna × hybrida hort. ex Backer*) – многолетнее травянистое растение семейства Cannaceae Juss, порядка Zingiberales Nakai с прямым ложным стеблем высотой 0,5-2,5 м, с подземным симподиальным корневищем и с очередными крупными широкоовальными листьями от сизо-зеленой до фиолетово-красной окраски (Дашкеев, 1975; Феофилова, 1991). В последние годы канна часто используется при оформлении парков, садов, скверов и представляет интерес благодаря крупным малиновым, красным, оранжевым, лососевым, желтым цветкам, собранным в соцветие-завиток. Цветок канна трехчленный и состоит из пяти мутовок. Первые мутовки образуют околоцветник, следующие две принадлежат андроцею, а последняя – гинецею. Внутренний круг андроцея неполный, состоит из стаминодия, закручивающегося наружу и из тычинки-лепестка. Внешний круг андроцея образуют три петалоидные стаминодии. Цветки

обоеполюе. Канны относятся к самоопылителям, но могут опыляться и перекрестно, при помощи ветра и насекомых. Плод представляет собой трехкамерную колючую коробочку округлой или продолговатой формы. Окраска плодов от бледно-зеленой до фиолетово-красной. Зрелые семена округлые, крупные, очень твердые, темно-коричневые или почти черные (Феофилова, 1997; Шолохова, 2006). Когда происходит рассеивание семян фуникулус остается в коробочке на плаценте. Он оказывается сжатым при созревании семян и на поверхности семян есть небольшое отверстие – «зародышевая щель». Зародыш имеет прямую, удлинненную форму и состоит из семядоли, зачатка главного зародышевого корня и 10-12 придаточных зародышевых корней. Семядоля дифференцирована на апикальную часть и «шейку», и на почечку с 2-3 зачаточными листьями (Плиско, 1985; Кузьмина, 2015).

Виды рода *Canna* L. происходят из тропических и субтропических районов Америки и юго-восточной Азии. Канна стала распространенным декоративным растением со второй половины 19 века, когда она впервые была использована для украшения парков Парижа. Вместе с тем, некоторые виды канны с давних времен выращивали как крахмалоносную культуру (*C. gigantea* Red., *C. flaccida* Dill., *C. coccinea* Rosc., *C. edulis* Ker.). Наряду с этим, сырье, которое получали из корневищ, перерабатывали для получения глюкозы. Канну съедобную *C. edulis* и в настоящее время возделывают в Америке, Индии, Индонезии, Корее, Австралии и на Гавайских островах в качестве крахмалоносного растения. Ее корневища содержат 27% крахмала. Канну съедобную также используют в традиционной азиатской кухне, в кондитерском производстве, а также как кормовую культуру. Известно применение *C. orientalis* Rosc. в качестве потогонного и мочегонного средства, *C. edulis* – как легкоусваиваемый диетический продукт при желудочно-кишечных заболеваниях (Ерушкевич, 1983; Шолохова, 2006).

В 1815 году первые растения канны были интродуцированы в Никитский ботанический сад (Дашкеев, 1975; Феофилова, 1991; Зубкова, 2015). На сегодняшний день коллекция канны садовой (рис. 2.1) представлена 26 сортами селекции НБС и 23 сортами зарубежной селекции.

В исследовании использовали перспективные сорта канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) из коллекционных насаждений Никитского ботанического сада (НБС, г. Ялта): 2 сорта селекции НБС (Дар Востока, Ливадия) и 2 сорта зарубежной селекции (Президент, Суевия).



Рис. 2.1. Участок коллекции канны садовой в НБС-ННЦ

В работах Г.Ф. Феофиловой приведена следующая характеристика изучаемых нами сортов:

‘**Ливадия**’ относится к сортам группы Крози (рис. 2.2, А). Цветки малиново-розовые, крупные, диаметр цветка 12,5 x 10 см, ширина стаминодиев 4,3-4,8 см. Листья зелено-фиолетовые, крупные (30 x 15 см). Высота растений 120 см. Коэффициент вегетативного размножения 4-7. Сорт пригоден для групповых и солитерных посадок.

‘**Дар Востока**’ относится к сортам группы Крози (рис. 2.2, Б). Высота растения 125-130 см. Цветки оранжевые, средние (11,1 x 10,5 см), ширина стаминодиев 4,9-5,1 см. Листья зеленые крупные (32 x 14 см). Коэффициент вегетативного размножения 4-8. Сорт пригоден для групповых посадок.

‘**Суевия**’ относится к сортам группы орхидеевидных (рис. 2.2, В). Цветки ярко-желтые, крупные (11,2 x 8,9 см), ширина стаминодиев 4,2-4,7 см, Листья

светло-зеленые, крупные (35,5 x 15,3 см). Высота растения 107 см. Коэффициент вегетативного размножения 3-4. Культура пригодна для групповых посадок.

‘Президент’ относится к сортам группы Крози (рис. 2.2, Г). Цветки красные, крупные (12,9 x 12,6 см), ширина стаминодиев 6,3-6,8 см. Листья зеленые, крупные (31,1 x 17,3 см). Высота растений 76,9 см. Коэффициент вегетативного размножения 3-5. Сорт пригоден для групповых посадок (Феофилова, 1991, 1997).

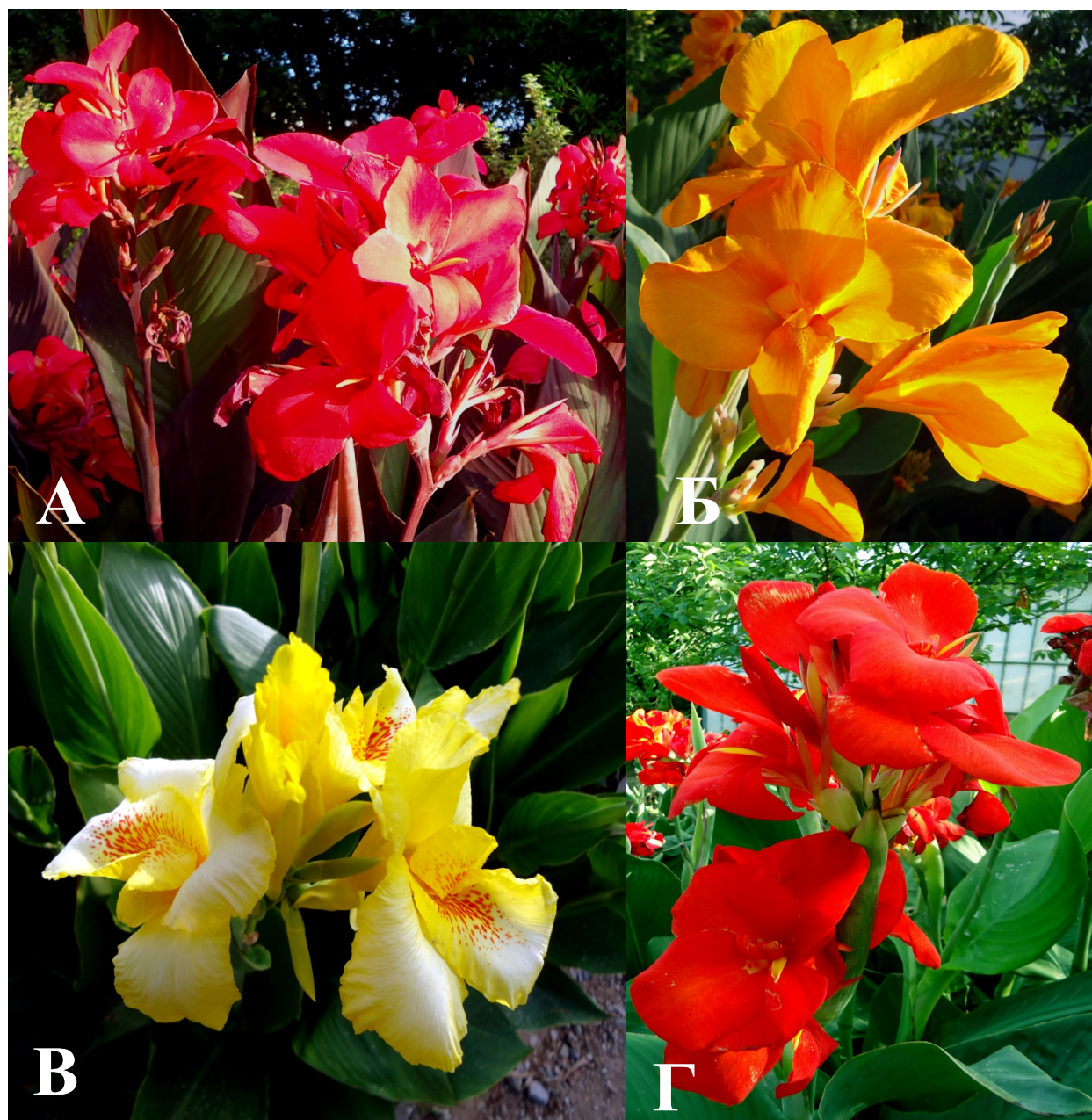


Рис. 2.2. Растения канны садовой: А) сорта Ливадия; Б) сорта Дар Востока; В) сорта Суевия; Г) сорта Президент

Типы вводимых эксплантов, условия стерилизации и асептики. В работе использовали методы культуры органов и тканей растений общепринятые (Калинин и др., 1992; Батыгина, Васильева, 2002; Бутенко, 1999) и разработанные в отделе биотехнологии растений НБС (Митрофанова и др., 1997; 2014а).

В качестве исходных эксплантов были взяты корневища (рис. 2.3) и коробочки (рис. 2.4; табл. А.1) канны садовой. Для введения в культуру *in vitro* были выделены вегетативные почки, зрелые и незрелые семена, изолированные зародыши, сегменты листьев, завязи и бутонов. Отбор растительного материала производился с апреля по ноябрь.



Рис. 2.3. Корневище канны садовой: А) сорта Ливадия с вегетативными почками; вегетативные почки канны сорта Суевия (Б) и сорта Ливадия (В), подготовленные к введению в условия *in vitro* (масштаб 1 см)

Для получения стерильных первичных эксплантов канны садовой применяли следующие антисептики: 70%-ный этанол (C_2H_5OH , Медасепт, Украина) и 3%-ный водный раствор гипохлорита натрия ($NaOCl$, Domestos, Венгрия) и 0,3-0,45% раствор трихлоризоциануронової кислоты и натриевой соли дихлоризоциануронової кислоты (43% $C_3O_3N_3Cl_3$, 20% $NaC_3O_3N_3Cl_2$, Дез ТАБ, Украина), которые освобождали изолированные экспланты от экзогенной инфекции.



Рис. 2.4. Коробочки с семенами канны садовой: А) сорта Суевия; Б) сорта Президент; В) сорта Ливадия; Г, Д) сорта Дар Востока (масштаб 1 см)

Стерилизацию растительного материала проводили в несколько этапов. Вегетативные почки, выделенные с корневищ растения канны садовой, промывали в мыльном растворе, затем ополаскивали в проточной воде и немного подсушивали. Смоченной в 70% этаноле, марлевой салфеткой протирали экспланты и срезали загрязненные или поврежденные листья, потемневшую и огрубевшую ткань основания вегетативной почки. Подготовленный к стерилизации, растительный материал перекладывали в стерильные банки (рис. 2.5) и последовательно обрабатывали растворами стерилизующих агентов, представленные в разделе 3 (табл. 3.1). Высечки листа размером $0,7-1,2 \text{ см}^2$ вычленили, с культивируемых в условиях *in vitro* и *in vivo*, растений после поверхностной стерилизации (табл. 3.1, схема 3). Завязи и бутоны канны садовой промывали в мыльной воде, затем последовательно погружали в растворы стерилизующих агентов (табл. 3.1, схема 4).

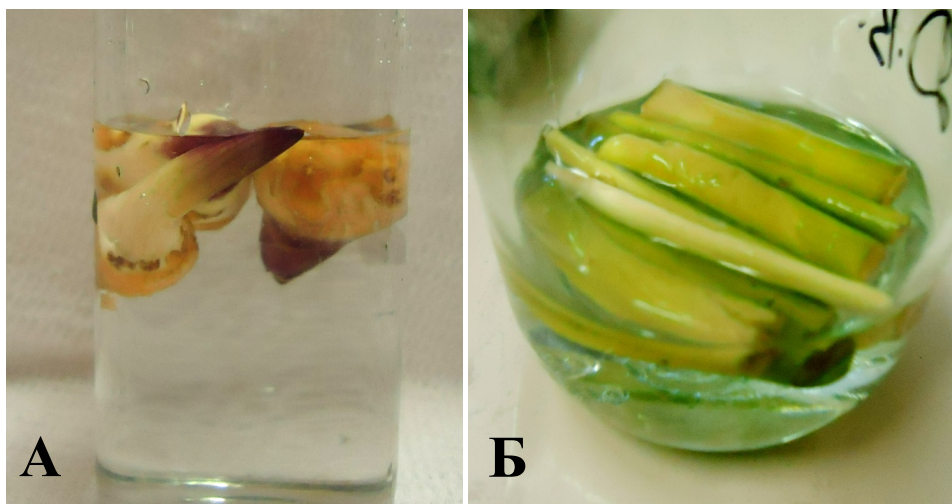


Рис. 2.5. Стерилизация растительного материала канны садовой:

А) вегетативные почки сорта Ливадия; Б) сегменты листа сорта Дар Востока

Коробочки канны садовой, характеризующиеся определенными показателями (табл. А.1) и отобранные в августе-ноябре, обрабатывали 96% этанолом, обжигали в пламени спиртовки, после чего извлекали семена. Из четырех изучаемых нами сортов полноценные семена образуют только Дар Вотока и Ливадия.

Эксперименты по стерилизации растительного материала проводили трижды в десятикратной повторности, учитывали среднее количество инфицированных, поврежденных стерилизующим агентом, и развившихся эксплантов. Результаты стерилизации растительного материала представлены в разделе 3.

Индукция развития эксплантов и регенерация микропобегов. Вегетативные почки помещали на модифицированную нами питательную среду Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962) с 30 г/л сахарозы, 1,0 % агар-агара (агар-агар «D19» (E406), «Hispanagar S.A.», Испания). Для инициации развития эксплантов в питательную среду добавляли 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃ (Sigma, США). Для проведения хемотерапии использовали вирозал (рибовирин, Sigma, США) в концентрации 3-5 мг/л и амиксин (Украина) в концентрации 2-4 мг/л (Митрофанова и др., 1997; Митрофанова, Митрофанова, 2001; Митрофанова и др., 2014б). Для индукции развития экспланты переносили в культуральную комнату с

температурой $+24\pm 1^{\circ}\text{C}$, 16-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 2-3 клк. Через 21 сутки культивирования экспланты пересаживали на свежеприготовленную питательную среду для индукции адвентивного побегообразования. На этапе собственно микроразмножения использовали Мурасиге и Скуга с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК, 0,64-2,55 мг/л ТДЗ (Sigma, США), WPM (Lloyd, McCown, 1980) с 0,75 мг/л БАП.

Изолированные зародыши вводили на агаризованную питательную среду Монье (Monnier, 1973) без регуляторов роста. Недоразвитые семена помещали на питательную среду Мурасиге Скуга с добавлением различных комбинаций и концентраций регуляторов роста: RG1 – МС + 1,5 мг/л БАП + 1,5 мг/л ИУК; RG2 – МС + 2 мг/л БАП + 1,75 мг/л ИУК; RG3 – МС + 2 мг/л БАП + 2 мг/л ИУК; RG4 – МС + 1,27 мг/л ТДЗ. Изолированные зародыши стратифицировали в условиях пониженной температуры (без освещения при температуре $+5\pm 1^{\circ}\text{C}$). Пробирки с семенами переносили в культуральную комнату с температурой $+24\pm 1^{\circ}\text{C}$, 16-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 2-3 клк. Проростки и растения также культивировали при стандартных условиях выращивания *in vitro*.

Высечки листа помещали на питательную среду МС, дополненную БАП, ИУК, ИУК, 2,4-Д и ТДЗ. Сегменты завязи и бутона культивировали на питательной среде МС с 2,4-Д, кинетином, БАП и ИУК. Для индукции развития эксплантов их культивировали при температуре $+24\pm 1^{\circ}\text{C}$, 16-часовом фотопериоде и интенсивности освещения 2-3 клк. Часть высечек листа, сегментов завязи и бутона помещали в термостат и культивировали без освещения.

Методика гистологических исследований морфогенеза канны садовой в условиях *in vitro*. Для проведения гистологических исследований в качестве фиксатора растительных объектов использовали смесь Карнуа (этиловый спирт:хлороформ:уксусная кислота 6:3:1). После фиксации объекты хранили в 70% этаноле.

Цитоэмбриологические препараты готовили по общепринятой методике (Паушева, 1970), заключающейся в последовательном обезвоживании и пропитывании материала ксилолом с последующим переводом объекта в парафин. Парафиновые срезы делали толщиной 12-15 мкм на ротационном микротоме марки МРТУ (Россия). Постоянные препараты окрашивали гематоксилином с подкраской алциановым синим (Жинкина, Воронова, 2000). Анализировали материал с помощью микроскопов “Jenaval” (Carl Zeiss, Германия) и AxioScopeA.1 (Zeiss, Германия) методом светлого поля, а также методом поляризационной микроскопии. Микрофотографии выполнены с помощью системы анализа изображения AxioCamERc5s и цифровой фотокамеры Olympus SP-350 с применением программы AxioVisionRel. 4.8.2.

Ризогенез *in vitro* микропобегов и адаптация *in vivo* регенерантов канны садовой. Индукцию ризогенеза у микропобегов осуществляли на питательных средах МС и Пирика (Pierik, 1976). На этапе укоренения в питательную среду вводили вещества ауксинового типа действия: α -нафтилуксусную кислоту (НУК) в концентрации 1 мг/л и индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) – 1,5 мг/л.

Регенеранты с хорошо развитыми корнями вынимали из культурального сосуда, освобождали от остатков агара на корнях, ополаскивали в емкости с дистиллированной водой и высаживали в вазоны с почвенным субстратом. Перед высадкой растений смесь разрыхляли и увлажняли стерильной дистиллированной водой. Для адаптации регенерантов к условиям *in vivo* использовали перлит, смесь перлита и стерильного почвенного субстрата (1:1) и смесь перлита и верхового торфа (1:1). Адаптацию проводили на СУВРе (стеллаж ускоренного вегетативного размножения). Для поддержания 100% влажности в качестве изоляторов применяли стеклянные стаканы, полиэтиленовые стаканы и полиэтиленовую пленку. Высаженные растения адаптировали при температуре +20-+25°C, полив проводили стерильной дистиллированной водой и на протяжении 30 суток. Эффективность адаптации

оценивали путем подсчета количества адаптированных растений к общему количеству высаженных регенерантов.

Методики определения структурных характеристик, физиологических особенностей водного режима и фотосинтетической активности меристематидов и регенерантов *in vitro* и *in vivo* некоторых сортов канны садовой. Для анализа анатомической структуры, содержания воды и фотосинтетической активности в условиях *in vitro* отбирались регенеранты и меристематиды канны садовой сортов Суевия и Ливадия. Объекты произрастали в культуральных сосудах при контролируемых температуре воздуха и освещении. Материал отбирали в 5-кратной повторности в каждом варианте.

Для анализа адаптационной способности *in vivo* пробы отбирали в оранжерее. Растения канны садовой на момент отбора проб произрастали 96-110 суток: ‘Суевия’ введена в культуру п₀ 22.03.14, высажена в почвенную смесь 26.09.14, 30.09.14; ‘Ливадия’ введена в культуру п₀ 22.03.14, высажена в почвенную смесь 26.09.14, 30.09.14.

Для определения линейных размеров микропобегов брали 3-5 растений. Морфометрию листьев для расчета индекса формы листовых пластин проводили с 10-кратной повторностью. Анатомические микропрепараты для анализа структуры листовых пластин (временные водные и глицериновые) изготавливали по общепринятой методике (Лотова, 2001). Анализ препаратов был проведен с помощью микроскопа AxioScope A.1 (Carl Zeiss) и программного приложения Axio Vision Rel. 4.8.2. Микрофотографии делали с помощью камеры AxioCam ERc5s.

В качестве физиологических критериев, характеризующих отношение к недостаточному водообеспечению и высоким температурам, были взяты общая оводненность листьев, определяемая методом термической сушки при +105°C (Генкель, 1968) и фракционный состав воды по методу Маринчика-Гусева (Лищук, 1991).

Параметры фотосинтетической активности (ФА) измеряли при помощи портативного флуориметра «Флоротест», произведенного в 2010 году в Институте кибернетики им. В.М. Глушкова НАН Украины. Листья предварительно адаптировали к темноте в течение 8 мин. Оптимальная длительность экстраполяции соответствовала времени выхода кривых Каутского на плато стабилизации (3 мин). Светодиод имеет максимальную интенсивность излучения на $\lambda = 470 \pm 20$ нм. В ходе экспериментов регистрировали следующие показатели: начальный уровень флуоресценции после облучения (F_0), максимальное (F_m) и стационарное (F_{st}) значения флуоресценции после световой адаптации. Рассчитывали переменную флуоресценцию, индекс жизнеспособности и фотосинтетическую активность (Байрон и др., 2000; Лысенко и др., 2013; Stirbet, Govindjee, 2011).

Депонирование эксплантов канны садовой *in vitro*. В качестве эксплантов использовали, культивируемые в условиях *in vitro*, вегетативные почки и меристемойды. В работе использовали методы общепринятые и разработанные в лаборатории биохимии, биотехнологии и вирусологии растений НБС-ННЦ (Митрофанова, 2011). Экспланты в культуральных сосудах переносили в холодильные камеры с регулируемой температурой (+2-+6°C) и интенсивностью освещения (0,1-0,5 клк). Экспланты помещали на модифицированную нами питательную среду Мурасиге и Скуга, с 60 г/л сахарозы, 0,2-0,4 г/л CCC (BASF, Германия). Состояние растительного материала оценивали через каждые 30 сут культивирования с помощью бонитировочной шкалы (табл. 2) (Митрофанова и др., 2010).

Таблица 2

**Бонитировка растений по внешним признакам после длительного
сохранения по 4-бальной шкале**

Балл	Характеристика
1	Материал уже погиб или инфицирован
2	Материал очень поврежденный, много листков потемнело
3	Материал частично поврежденный, 2/3 листков зелених
4	Материал неповрежденный, допускается 1 бурый листок

Кроме бонитировки оценивали материал по таким показателям:

- длина микропобега, длина меристемоида;
- количество образовавшихся меристемOIDов;
- жизнеспособность (Митрофанова и др., 2010).

Опыты по прорастанию семян канны садовой. Семена 2 сортов канны садовой (Дар Востока и Ливадия), собирали с растений на коллекционном участке НБС-ННЦ. Для индукции прорастания семян использовали их механическую, физическую и химическую обработку.

Механическое воздействие (скарификация) заключалась в повреждении острым скальпелем семенной кожуры или их надкалывание молотком. Физическое воздействие (стратификация) включало выдерживание семян в холодильнике при +5°C в течение 1 суток, затем погружение в кипяток на 10 сек и охлаждение в холодной воде. Химическое воздействие состояло в погружении семян канны садовой в высококонцентрированный раствор серной кислоты в течение 1 и 2 часов и последующим отмыванием в водопроводной воде (Ляшенко, Андон, 1981).

Семена после стратификации, скарификации и без предпосевной обработки высевали в глиняные сосуды с влажным субстратом (стерильный почвенный субстрат или перлит). Количество проросших семян определяли через каждую неделю. Повторность опыта была трехкратной.

Все фотографии исследуемых объектов и рисунки выполнены автором. В каждом варианте опыта анализировали не менее 10-15 эксплантов в 3-х кратной повторности. Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили по общепринятым методам математической статистики (Рокицкий, 1967; Лакин, 1991) с использованием стандартного пакета документов программ Microsoft Office Excel 2003. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента при $P \leq 0,05$. В таблицах представлены средние арифметические и их средние квадратические ошибки, а на графиках – доверительные интервалы.

РАЗДЕЛ 3
ИЗУЧЕНИЕ ОСНОВНЫХ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ИНДУКЦИЮ
РАЗВИТИЯ ЭКСПЛАНТОВ *CANNA* × *HYBRIDA HORT.* EX BACKER
В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Одним из определяющих факторов, который влияет на реализацию морфогенетического потенциала в процессе микроразмножения является тип экспланта (Митрофанова, 2011; Mitrofanova, Mitrofanova, 2000). В наших исследованиях использовали различные экспланты канн садовой: сегменты бутонов, завязей, листьев, вегетативные почки, зрелые и незрелые семена и изолированные зародыши. Так, при культивировании высечек листа наблюдали потемнение некоторых эксплантов на 21-е сут культивирования. Вместе с тем, сегменты листового черешка сохраняли жизнеспособность более длительный период (до 45 сут), чем высечки из листовой пластинки (до 35 сут). Культивирование *in vitro* незрелых семян, сегментов бутонов, завязей на питательной среде МС с различными регуляторами роста вызывало разрастание тканей. Однако при длительном культивировании эти экспланты постепенно темнели и отмирали. Было установлено, что высоким морфогенетическим потенциалом обладали вегетативные почки и изолированные зародыши.

**3.1. Разработка протокола получения асептической культуры
первичных эксплантов.**

Стерилизация является одним из сложных этапов при разработке биотехнологических приёмов размножения растений. Известно, что в качестве стерилизующих растворов необходимо использовать те, которые обеспечивают получение наибольшего процента неповрежденных тканей, способных к росту

при наименьшем количестве инфицированных эксплантов. Кроме того, такого же правила необходимо придерживаться при выборе экспозиции стерилизации.

В таблице 3.1 представлены схемы стерилизации первичных эксплантов канны садовой.

Таблица 3.1.

Схемы стерилизации первичных эксплантов канны садовой

Схема стерилизации	Этап стерилизации	Антисептики	Производитель	Экспозиция
Вегетативные почки				
№ 1	1	70% C ₂ H ₅ OH	Медасепт, Украина	1 мин
	2	NaOCl	Domestos, Венгрия	17 мин
	3	5-кратная промывка в дистиллированной воде		
№ 2	1	70% C ₂ H ₅ OH	Медасепт, Украина	1 мин
	2	43% C ₃ O ₃ N ₃ Cl ₃ , 20% NaC ₃ O ₃ N ₃ Cl ₂	Дез ТАБ, Украина	25-40 мин
	3	5-кратная промывка в дистиллированной воде		
	4	1% Thimerosal	Merk, Германия	10-20 мин
	5	5-кратная промывка в дистиллированной воде		
Сегменты листа				
№ 3	1	70% C ₂ H ₅ OH	Медасепт, Украина	1 мин
	2	43% C ₃ O ₃ N ₃ Cl ₃ , 20% NaC ₃ O ₃ N ₃ Cl ₂	Дез ТАБ, Украина	10 мин
	3	5-кратная промывка в дистиллированной воде		
	4	1% Thimerosal	Merk, Германия	10 мин
	5	5-кратная промывка в дистиллированной воде		
Сегменты завязи и бутонов				
№ 4	1	70% C ₂ H ₅ OH	Медасепт, Украина	1 мин
	2	43% C ₃ O ₃ N ₃ Cl ₃ , 20% NaC ₃ O ₃ N ₃ Cl ₂	Дез ТАБ, Украина	15 мин
	3	5-кратная промывка в дистиллированной воде		
	4	1% Thimerosal	Merk, Германия	15 мин
	5	5-кратная промывка в дистиллированной воде		

Так, в ходе экспериментов было установлено, что способ стерилизации различным образом оказывал влияние на количество инфицированных эксплантов (вегетативных почек) исследуемых сортов канны садовой. На рисунке 3.1 представлены результаты использования двух схем стерилизации, информация по которым отражена в таблице 3.1.

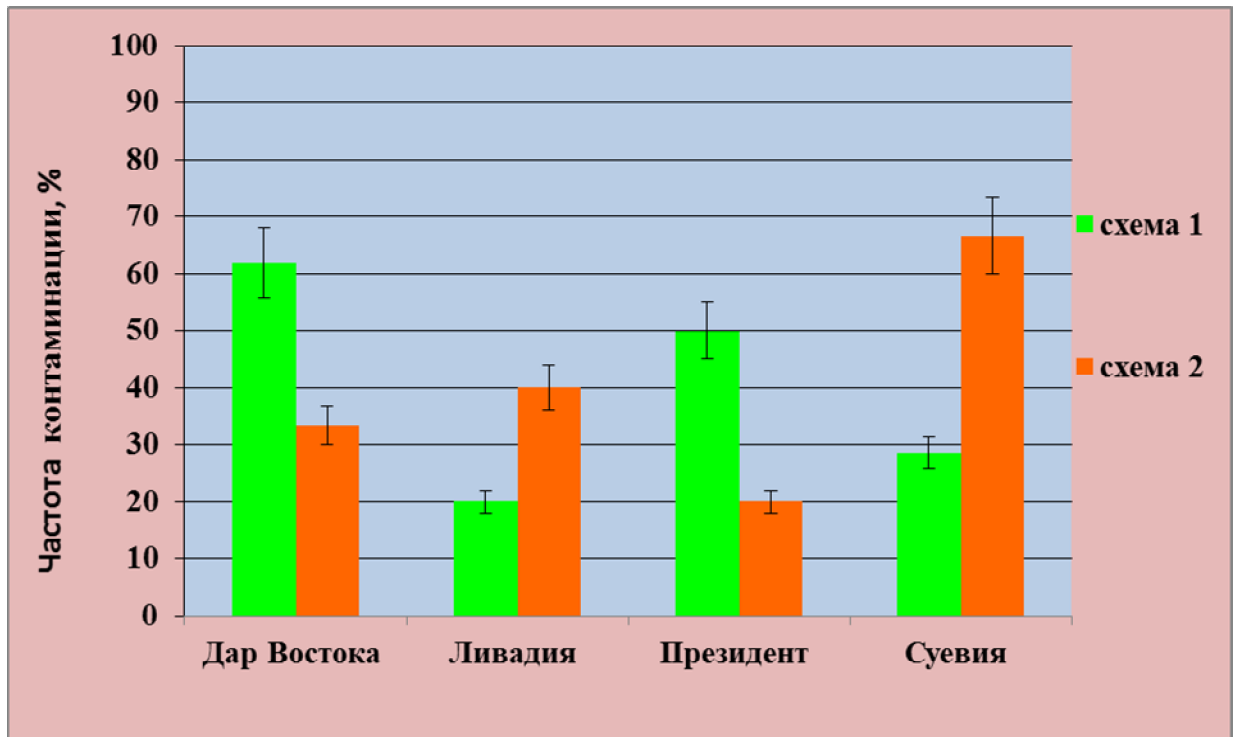


Рис. 3.1. Частота контаминации эксплантов канны при использовании двух схем стерилизации: схема 1 (3% гипохлорит натрия);
схема 2 (раствор препарата Дез ТАБ)

Среди испытанных антисептиков раствор препарата Дез ТАБ, содержащий активный хлор, позволил снизить количество инфицированных эксплантов у сортов Президент и Дар Востока до 20 и 33,4% соответственно. При этом, частота контаминации данных сортов при стерилизации 3% гипохлоритом натрия составила 50 и 61,9% соответственно. Вместе с тем, для сортов Ливадия и Суевия использование схем стерилизации с гипохлоритом натрия снижала частоту контаминации до 20 и 28,6% соответственно.

Из таблицы 3.2 видно, что стерилизация раствором гипохлорита натрия оказывала различное воздействие на экспланты исследуемых сортов канны садовой. Эксперименты показали, что лучше всего перенесли стерилизацию экспланты канны сорта Суевия. Так, у данного сорта спустя 15 суток культивирования не было отмечено потемневших эксплантов, количество инфицированных (21,8%) эксплантов оказалось меньше по сравнению с другими исследуемыми сортами (33-55%).

**Результаты стерилизации эксплантов канны садовой при
использовании 3%-ного раствора гипохлорита натрия**

Сорт	Количество эксплантов, %		
	инфицированных	потемневших	сохранивших жизнеспособность более 20 суток
Дар Востока	33,3±2,9	33,2±2,4	33,5±4,1
Ливадия	33,0±2,4	12,3±1,3	54,7±4,1
Президент	55,0±4,0	16,0±1,6	29,0±2,0
Суевия	21,8±3,3	0	78,2±4,5

Экспланты сортов Президент и Дар Востока сохранили низкую жизнеспособность на уровне 29 и 33,5%. Высокая частота контаминации была у эксплантов ‘Президент’ 55,0%, что может быть также связано с наличием эндогенной инфекции, которая может проявляться в более поздние сроки культивирования (Тевфик и др., 2012а; 2012б).

Вместе с тем, на 5 сут культивирования отмечали выделение некоторыми эксплантами фенольных соединений в питательную среду (рис. 3.2), что чаще всего приводило к задержке развития и гибели самого экспланта. Пассаж на свежеприготовленную питательную среду через 10-14 суток после введения уменьшил негативное воздействие фенольных соединений и позволил сохранить жизнеспособность эксплантов.

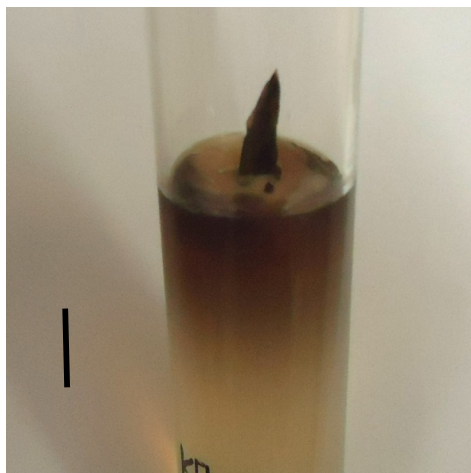


Рис. 3.2. Выделение эксплантами канны фенольных соединений
в питательную среду на начальном этапе культивирования

В результате наших исследований, было выявлено, что обжиг в пламени спиртовки коробочек канны оказался эффективным способом стерилизации, который позволил получить у сортов Ливадия и Суевия жизнеспособные экспланты, свободные от контаминации (табл. 3.3). При этом у сортов канны садовой Дар Востока и Президент частота контаминации составила 5 и 14% соответственно.

Таблица 3.3

Результаты стерилизации различных эксплантов канны садовой

Тип исходного экспланта	Способ стерилизации	Частота контаминации, %			
		Дар Востока	Ливадия	Президент	Суевия
коробочки	стерилизация обжигом в пламени спиртовки	5±0,7	0	14±1,1	0
высечки листа	схема 3	0	0	25±0,3	0
бутоны	схема 4	11±1,2	—*	33±0,4	—
завязи	схема 4	50±8,5	—	21±0,2	—

Примечание: * — экспланты не вводили в условия *in vitro*; схемы 3, 4 представлены в таблице 3.1.

Эксперименты по стерилизации высечек листа показали, что последовательное погружение эксплантов в 0,3% раствор препарата Дез ТАБ и 1% раствор Timerosal способствовало получению эксплантов сортов Дар Востока, Ливадия и Суевия, свободных от эндогенной и экзогенной инфекций. Вместе с тем, у сорта Президент количество инфицированных эксплантов составило 25%. Наряду с этим, при стерилизации бутонов и завязей сортов Дар Востока и Президент у эксплантов была получена частота контаминации на уровне 11-50%. Однако, при их культивировании наблюдали сильное выделение веществ фенольной природы особенно у сорта Президент.

В процессе изучения влияния различных сроков введения в условия *in vitro* на состояние эксплантов канны садовой в 2011 году было установлено, что среди изучаемых сортов за весь период с августа по ноябрь высокой жизнеспособностью отличался сорт Суевия (рис. Б.1). Так, в зависимости от сроков отбора количество жизнеспособных эксплантов у данного сорта варьировало от 50 до 100%.

В ходе экспериментов было выявлено, что у сорта Дар Востока жизнеспособные экспланты (67%) были получены только в сентябре и ноябре. Вместе с тем было показано, что для всех изучаемых сортов октябрь оказался неблагоприятным периодом отбора и введения в условия *in vitro* эксплантов. У двух сортов канны садовой (Президент и Дар Востока) жизнеспособность эксплантов была равна нулю. У остальных сортов по сравнению с другими сроками отбора меньшее количество культивируемых жизнеспособных эксплантов отмечено в октябре (Тевфик и др., 2012б). Наряду с этим, в октябре выявили высокую частоту инфицирования у всех четырех сортов канны садовой (50-100%). Однако, среди исследуемых сортов сорт Суевия имел низкую частоту контаминации эксплантов (рис. Б.2). У сорта канны садовой Президент во все сроки отбора и введения в условия *in vitro* наблюдали от 33 до 40% инфицированных эксплантов.

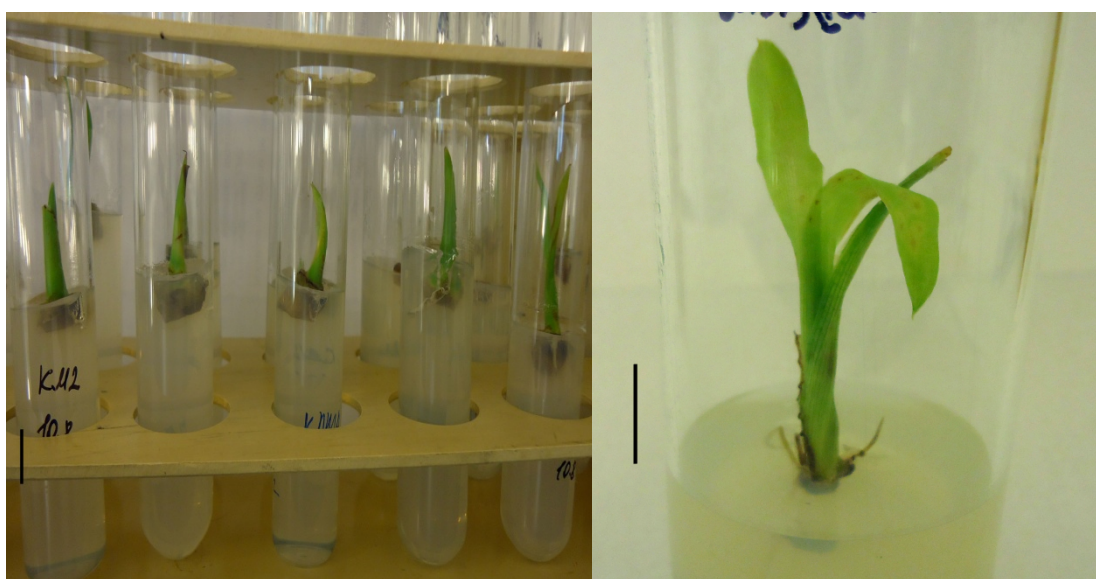
Таким образом, из используемых типов эксплантов наибольшую частоту контаминации отметили при введении в условия *in vitro* вегетативных почек, что характерно для представителей порядка Zingiberales и было также показано при проведении биотехнологических исследований в ряде лабораторий Европы, Индии и Китая (Rodrigues, 2005; Nietzsche et al., 2006).

3.2. Влияние срока отбора и генотипа на процесс регенерации микропобегов.

Известно, что способность введенных эксплантов к морфогенезу и регенерации микропобегов в условиях *in vitro* чаще всего совпадает с активной фазой роста растения. Морфогенетический потенциал эксплантов зависит от

срока отбора и определяется изменением его физиолого-биохимического состояния в процессе регенерации. В наших исследованиях вегетативные почки отбирали с вегетирующих растений в период с апреля по ноябрь, семена – с августа по ноябрь.

Результаты исследования показали, что у эксплантов (вегетативных почек) канны садовой, сохранивших жизнеспособность на 30-е сутки культивирования, отмечали увеличение длины микропобегов и постепенное разворачивание листьев (рис. 3.3).



А

Б

Рис. 3.3. Экспланты канны садовой сорта Суевия (масштаб 1 см):
А) на этапе введения в культуру *in vitro*; Б) разворачивание листьев

Как видно из данных таблицы 3.4, активный рост эксплантов наблюдали у канны сорта Суевия (0,45-1,43 см). При этом у экспланта разворачивалось до 2 листьев. Показано, что только у эксплантов сорта Ливадия, введенных в условия *in vitro* в апреле (1,18 см) и в декабре (0,33 см) происходило удлинение микропобегов. Экспланты канны сортов Президент и Дар Востока, введенные в октябре, развивались активнее 0,9 и 0,67 см, соответственно (Тевфик, Митрофанова, 2012). В остальные сроки отбора наблюдали снижение активности роста эксплантов этих сортов.

Таблица 3.4

Удлинение эксплантов различных сортов канны садовой (см) на 30-е сутки культивирования на питательной среде МС, дополненной 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃ в зависимости от срока введения в 2012 г.

Сорт	апрель	июль	август	сентябрь	октябрь	ноябрь	декабрь
Дар Востока	0,30±0,10	—*	0	0,25±0,07	0,67±0,11	0,53±0,18	0,63±0,19
Ливадия	1,18±0,23	0	—	0	—	0	0,33±0,11
Президент	0	0,58±0,08	0	0,55±0,08	0,90±0,14	0	0,60±0,07
Суевия	1,43±0,22	0,55±0,08	0,45±0,07	1,28±0,47	1,37±0,11	1,33±0,29	0,70±0,12

Примечание: *— экспланты не были введены в условия *in vitro*

В ходе экспериментов было установлено, что появление дополнительных микропобегов в основании эксплантов на питательной среде МС, дополненной 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃, зависило от срока введения в условия *in vitro* и от генотипа исходного экспланта. Так, адвентивное побегообразование у сорта Дар Востока (рис. 3.4А) в ноябре 2012 г. наблюдали на 22 сутки. При этом, в апреле и октябре дополнительные микропобеги формировались на 32-37 сутки культивирования (табл. 3.5). Вместе с тем частота адвентивного побегообразования канны садовой сорта Дар Востока была на уровне 33,3-50% в зависимости от срока отбора эксплантов. При этом, у сорта Дар Востока отмечали появление до двух адвентивных побегов на эксплант. Длина таких микропобегов зависила от срока отбора эксплантов. Так, в апреле и октябре этот показатель был на уровне 0,3-0,33 см, а в ноябре — в 2 раза выше (0,65 см).

Кроме того, результаты исследований показали, что в основании микропобегов сорта Суевия появление дополнительных побегов происходило только в апреле на 38 сут культивирования (рис. 3.4 Б). У данного сорта частота адвентивного побегообразования (57,0%) была выше, чем у сорта Дар Востока (33,3%). Микропобеги сорта Суевия образовывали один адвентивный побег на эксплант и его длина на 60 сут культивирования достигала 0,5 см.

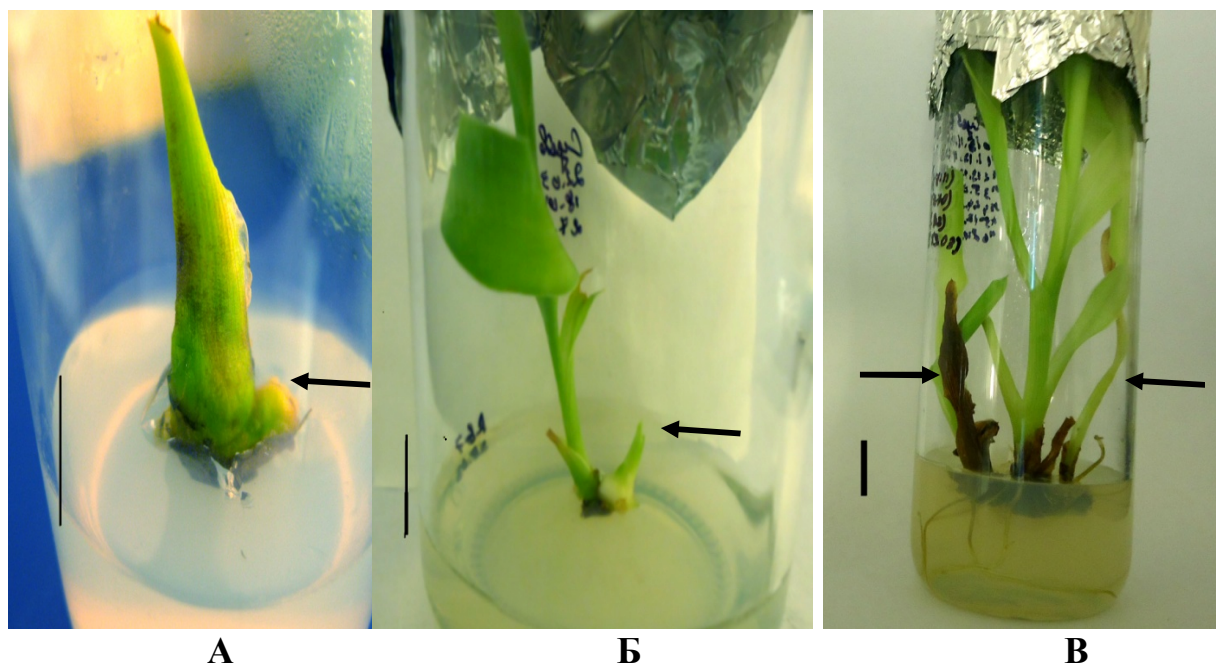


Рис. 3.4. Адвентивное побегообразование у *C. hybrida* (масштаб 1 см) на питательной среде МС, дополненной 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃:

А) у сорта Дар Востока на 22 сут культивирования;

Б) у сорта Суевия на 60-е сут; В) у сорта Суевия на 120-е сут

Таблица 3.5

Влияние генотипа и срока введения эксплантов на адвентивное побегообразование на питательной среде МС, дополненной 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃

Сорт	Срок появления адвентивных побегов (среднее по эксплантам), сут			Частота адвентивного побегообразования, %			Длина адвентивных побегов на 60-сут культивирования, см		
	апрель	октябрь	ноябрь	апрель	октябрь	ноябрь	апрель	октябрь	ноябрь
Дар Востока	37	32	22	33,3	50	40	0,3±0,08	0,33±0,04	0,65±0,11
Суевия	38	—*	—	57,0	—	—	0,5±0,09	—	—

Примечание: * – адвентивного побегообразования не отмечено

Вместе с тем, при длительном беспересадочном культивировании эксплантов на питательной среде МС, дополненной 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃ отмечали формирование 2-х дополнительных побегов на эксплант. На 120-е сут

культивирования адвентивные побеги достигали 3-4 см (рис. 3.4В) и их пересаживали на свежеприготовленную питательную среду.

Таким образом, результаты наших экспериментов показали, что на регенерацию микропобегов из первичных эксплантов сортов канны *in vitro* оказывает влияние совокупность факторов: тип экспланта, генотип донорного растения, режимы стерилизации и сроки отбора растительного материала. Среди изучаемых нами типов эксплантов регенерационным потенциалом обладали вегетативные почки и изолированные зародыши. Стерилизация вегетативных почек, растворами Дез ТАБ и 3% гипохлорита натрия позволила снизить частоту контаминации до 20-33,4% в зависимости от сорта.

РАЗДЕЛ 4

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОТЕНЦИЙ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ КАННЫ САДОВОЙ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ

Одним из лимитирующих факторов, который оказывает влияние на процессы морфогенеза органов и тканей растений *in vitro* является состав питательной среды (Бутенко, 1964; Калинин и др., 1980; Митрофанова, 2011; Basal, 2007). Для культивирования эксплантов канны садовой нами были использованы агаризованные питательные среды: Мурасиге и Скуга, Монье, Пирика и WPM (табл. 4.1).

Таблица 4.1

Базовый состав минеральных солей питательных сред, применяемых для микроразмножения растений канны садовой, мг/л

Минеральные соли	МС	Монье	Пирика	WPM
Макроэлементы:				
NH_4NO_3	1650,0	825,0	206,0	400,0
KNO_3	1900,0	1900	950,0	—
KCl	—	350	—	—
K_2SO_4	—	—	—	990,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440,0	880,0	220,0	96,0
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	—	—	—	556,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370,0	370,0	185,0	370,0
KH_2PO_4	170,0	170,0		170,0
Na_2EDTA	37,3	14,9	37,3	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	11,1	27,8	27,8
Микроэлементы:				
H_3BO_3	6,2	12,4	6,2	6,2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	—	22,3	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	21,0	8,6	8,6
KI	0,83	1,66	0,83	—
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,5	0,25	0,025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,05	0,025	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,05	0,025	—

Наряду с макро- и микроэлементами в состав питательных сред входят витамины, регуляторы роста, сахароза, агар, растворенные в дистиллированной воде.

4.1. Влияние регуляторов роста на процесс регенерации микропобегов из вегетативных почек на этапах индукции их развития и собственно микроразмножения

Добавление регуляторов роста цитокининного и ауксинного типов действия в питательные среды зависит от поставленных задач исследований и этапов клонального микроразмножения (Митрофанова, 1997; Сельскохозяйственная биотехнология, 1998; Kyte, 1987; George et al., 2008).

Как показали наши исследования, использование питательной среды МС, содержащей 2,0-4,0 мг/л БАП и 1,0 мг/л ГК₃, способствовало удлинению микропобегов сорта Суевия на 10-е сутки культивирования. На 30-е сутки культивирования их длина увеличилась на 2,5 см. Вместе с тем, спустя 3 месяца культивирования в условиях *in vitro* отмечали образование $3,33 \pm 0,36$ развернутых листьев на эксплант (табл. 4.1). При этом длина микропобегов увеличилась на $5,5 \pm 0,74$ см.

Таблица 4.1

Изменение морфологических признаков эксплантов *C. hybrida* сорта Суевия при культивировании *in vitro* на питательной среде МС с 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃

Морфологические признаки	Продолжительность культивирования, месяц		
	3	6	9
Увеличение длины микропобегов, см	$5,50 \pm 0,74$	$8,92 \pm 0,63$	$11,33 \pm 0,87$
Количество развернувшихся листьев на микропобег, шт.	$3,33 \pm 0,36$	$4,67 \pm 0,46$	$5,33 \pm 0,46$
Количество образовавшихся адвентивных побегов на эксплант, шт.	$1,25 \pm 0,22$	$1,60 \pm 0,27$	$1,60 \pm 0,27$
Длина адвентивных побегов, см	$1,10 \pm 0,22$	$5,38 \pm 0,71$	$7,20 \pm 0,97$
Количество развернувшихся листьев на адвентивный побег, шт.	—	$1,20 \pm 0,22$	$2,40 \pm 0,27$

В зависимости от продолжительности культивирования у эксплантов сорта Суевия наблюдали изменение морфологических признаков. Так, на 180-е сутки культивирования длина микропобегов увеличивалась в 1,4 раза по сравнению с этим показателем на 270-е сутки. При этом, у эксплантов после 6 месяцев культивирования сформировалось в 2 раза больше развернувшихся листьев чем через 9 месяцев.

В процессе проведения экспериментов было отмечено, что появление адвентивных побегов у отдельных эксплантов сорта Суевия происходило на 65-е сутки культивирования. Микропобеги канны садовой, сохранившие жизнеспособность на 90-е сутки культивирования, формировали в среднем $1,25 \pm 0,22$ дополнительных побегов на эксплант. Спустя 6 месяцев в условиях *in vitro* количество образовавшихся адвентивных побегов на эксплант увеличилось в среднем до $1,6 \pm 0,27$ (Тевфик, Митрофанова, 2013б). Однако при последующем культивировании этот показатель оставался неизменным.

Наряду с регенерацией адвентивных микропобегов при культивировании *in vitro* у эксплантов сорта Суевия увеличивалась и их длина. При этом, показатель роста микропобегов через 6 месяцев культивирования (удлинение на 4,28 см) был значительно больше чем через 9 (удлинение на 1,82 см). Вместе с ростом микропобегов наблюдали постепенное разворачивание листьев. Так, на 180-е сутки культивирования на 1 адвентивный микропобег образовалось в среднем $1,2 \pm 0,22$ листа. В последующие три месяца культивирования их количество возросло в 2 раза (Тевфік, Митрофанова, 2012).

Для индукции адвентивного побегообразования нами были использованы следующие вещества цитокининного типа действия: БАП и ТДЗ. Низкие концентрации ТДЗ (0,64 мг/л) не вызывали образования адвентивных структур в культуре вегетативных почек исследуемых сортов. У канны садовой Дар Востока и Суевия на среде МС, дополненной 1,27 мг/л ТДЗ на 12-е сутки культивирования отмечали начало формирования адвентивных побегов (рис. 4.1А, В).

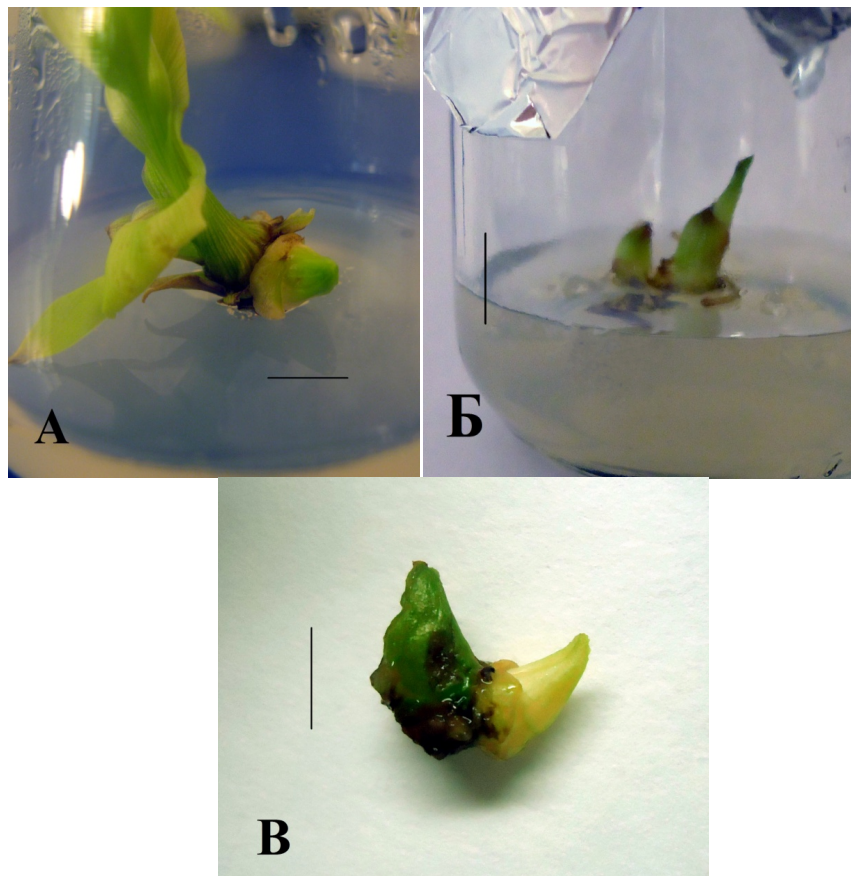


Рис. 4.1. Адвентивное побегообразование канны садовой на 21-е сутки культивирования: А) у сорта Суевия на питательной среде МС с 1,27 мг/л ТДЗ; Б) у сорта Ливадия на МС с 1,91 мг/л ТДЗ; В) у сорта Дар Востока на среде МС с 1,27 мг/л ТДЗ (масштаб 1 см)

Исследования показали, что на 18-е сутки культивирования длина дополнительного микропобега у сорта Суевия достигала 1,2 см. Микропобег имел ярко зеленую окраску. Дальнейшее культивирование способствовало увеличению количества адвентивных микропобегов канны садовой. Так, на 60-е и 90-е сутки культивирования микропобеги сорта Суевия образовали в среднем $2,75 \pm 0,29$ и $4,25 \pm 0,29$ дополнительных побегов/эксплант соответственно. Вместе с тем, при культивировании микропобегов сорта Дар Востока коэффициент размножения был ниже в 1,5 раза (табл. 4.2). При длительном культивировании эксплантов канны садовой сорта Суевия (150 сут и субкультивировании каждые 30 сут на свежеприготовленную питательную среду) отмечали образование до 7 адвентивных микропобегов на эксплант (Тевфик и др., 2014б).

**Влияние регуляторов роста на образование адвентивных микропобегов
канн садовой, шт.**

Сорт	Регулятор роста и его концентрация, мг/л	Продолжительность культивирования, сут		
		30 (контроль)	60	90
Суевия	1,27 ТДЗ	1,25±0,29	2,75±0,29	4,25±0,29*
	1,5 БАП + 1,5 ИУК	0,75±0,29	2,00±0,47	2,00±0,47
Дар Востока	1,27 ТДЗ	0,75±0,29	1,75±0,29	2,75±0,29
	1,5 БАП + 1,5 ИУК	—	—	—

Примечание: * – установлено достоверное различие с уровнем значимости $P \leq 0,05$

Вместе с тем, при добавлении в питательную среду МС 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК длина адвентивного микропобега на 18-е сут культивирования у сорта Суевия достигала 3 см. Окраска такого микропобега была светло-зеленой. Однако при дальнейшем культивировании на данной питательной среде отмечали меньшее количество сформировавшихся адвентивных побегов на эксплант, по сравнению с тем когда использовали ТДЗ в концентрации 1,27 мг/л. На 60 сут культивирования на питательной среде, дополненной БАП и ИУК образовалось в среднем $2,0 \pm 0,47$ дополнительных микропобегов на эксплант. При этом при длительном культивировании коэффициент размножения оставался неизменным. Это может быть связано с параллельным активным корнеобразованием микропобегов ($6,25 \pm 1,19$ корней на эксплант, длиной от 2 до 8 см).

Следует отметить, что при культивировании микропобегов сорта Дар Востока на среде МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК образование дополнительных побегов не происходило. Культивирование эксплантов канн садовой сорта Ливадия на питательной среде МС с 1,91 мг/л ТДЗ способствовало удлинению адвентивных микропобегов (рис. 4.1Б). Вместе с тем, у сорта Ливадия на питательной среде Пирика, дополненной 0,5 мг/л кинетина и 1,0 мг/л ИУК наблюдали угнетение роста микропобега и постепенное потемнение листьев.

Особое внимание заслуживает тот факт, что продолжительное культивирование эксплантов сорта Суевия приводило к образованию в основании микропобегов меристемоидов. Существует следующее определение этого термина: «Меристемоид — локализованная группа клеток каллуса, характеризующихся способностью к накоплению крахмала, РНК и белка, и дающая начало адвентивным (придаточным) побегам или корням» (Заид и др. 2008, с.136). В зарубежных публикациях также встречается другое название меристемоидов – протокормоподобные структуры (Sakai, Imai, 2007).

В базальной части отдельных микропобегов формировались меристемоиды зеленой и светло-бежевой окраски. Количество меристемоидов и их окраска зависила от продолжительности культивирования. Установлено, что на 120 сут культивирования образуются меристемоиды зеленой окраски (5,67 шт./эксплант). Дальнейшее культивирование способствует появлению меристемоидов бежевой окраски (табл. 4.3). Повышение концентрации ТДЗ до 1,91 мг/л при культивировании эксплантов сорта Суевия приводило к индукции образования ярко-зеленого каллуса. Однако увеличение продолжительности культивирования ингибировало деление каллусных клеток и вызывало некроз некоторых участков каллуса.

Таблица 4.3

Влияние продолжительности культивирования на питательной среде МС, с 1,27 мг/л ТДЗ на образование меристемоидов канны сорта Суевия

Продолжительность культивирования, сутки	Количество образовавшихся меристемоидов, шт./эксплант	Количество меристемоидов зеленой окраски, %	Количество меристемоидов бежевой окраски, %
120 (контроль)	5,67±0,41	100	0
150	8,50±0,33*	76,5	23,5
165	13,50±0,33*	43,5	56,5
180	20,25±0,55*	33,3	66,7

Примечание: * — установлено достоверное различие с уровнем значимости $P \leq 0,05$

Исследования показали, что длительное культивирование микропобегов сорта Дар Востока (более 50 сут) на питательных средах, содержащих ТДЗ, также приводило к формированию меристемоидов (рис. 4.2).

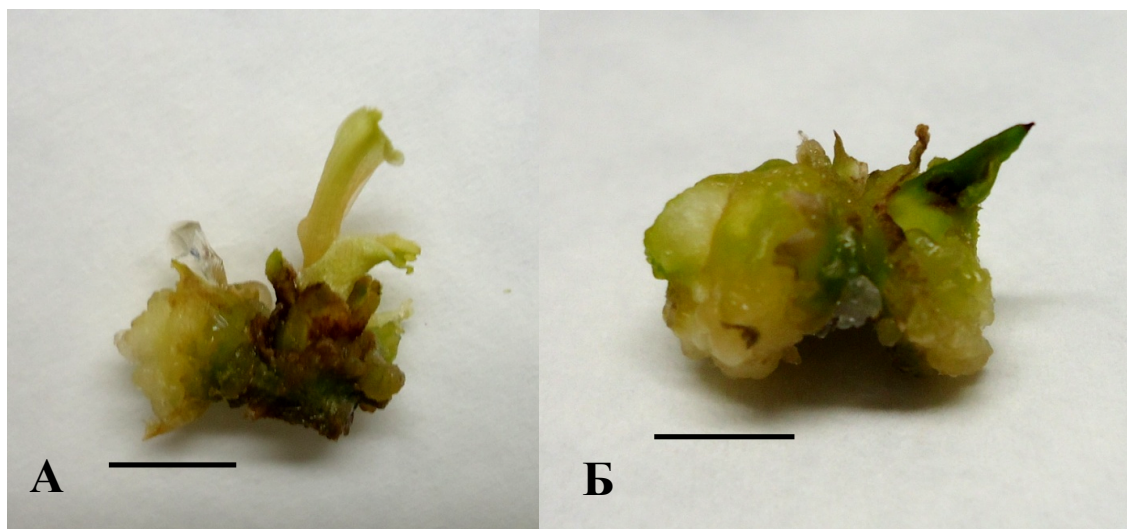


Рис. 4.2. Формирование меристемоидов канны садовой сорта Дар Востока на 60-е сут культивирования: А) на питательной среде с 1,91 мг/л ТДЗ; Б) на питательной среде с 1,27 мг/л ТДЗ (масштаб 1 см)

Так, например, отделение образовавшихся адвентивных побегов и дальнейшее культивирование на питательной среде с 1,27 мг/л и 1,91 мг/л ТДЗ на 90 сут культивирования приводило к появлению 4 меристемоидов на эксплант (рис. 4.3).

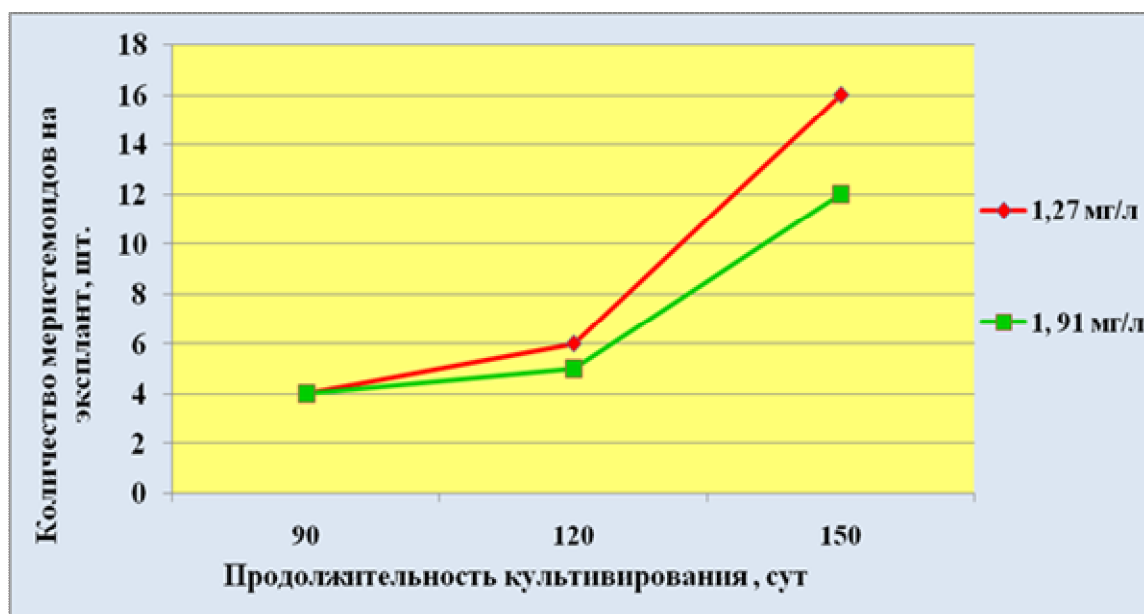


Рис. 4.3. Образование меристемоидов у канны садовой сорта Дар Востока на питательной среде МС с ТДЗ

Вместе с тем, дальнейшее субкультивирование показало, что применение более низкой концентрации ТДЗ индуцировало образование большего количества меристематических на explant (15 шт.) и сформировавшиеся меристематические были крупнее и более выраженными по сравнению с полученными на среде с 1,91 мг/л ТДЗ (12 шт.).

У сорта канн садовой Ливадия на питательной среде МС, дополненной 2,55 мг/л ТДЗ, на 10-е сутки культивирования отмечали появление адвентивных побегов. При дальнейшем культивировании таких explantов наблюдали постепенное потемнение и отмирание основного побега. Отделение адвентивных побегов от основного побега и последующее культивирование вызывало формирование меристематических и новых адвентивных почек. Через 90 сут культивирования *in vitro* на этой питательной среде коэффициент размножения достигал в среднем $6,5 \pm 0,75$ (табл. 4.4). При увеличении продолжительности культивирования до 100 сут нами было отмечено, что образовавшиеся меристематические начинали коричневеть.

Таблица 4.4

Формирование меристематических канн садовой сорта Ливадия в зависимости от концентрации ТДЗ в питательной среде МС

Продолжительность культивирования, сут.	1,91 мг/л ТДЗ (контроль)		2,55 мг/л ТДЗ	
	Количество меристематических на explant, шт.	Средняя длина меристематических, см	Количество меристематических на explant, шт.	Средняя длина меристематических, см
30	$2,00 \pm 0,47$	$0,90 \pm 0,19$	$1,75 \pm 0,29$	$0,53 \pm 0,13$
60	$2,25 \pm 0,29$	$0,63 \pm 0,03$	$4,00 \pm 0,71^*$	$0,49 \pm 0,08$
90	$3,75 \pm 0,29$	$0,55 \pm 0,07$	$6,50 \pm 0,75^*$	$0,50 \pm 0,05$
120	$11,00 \pm 0,47$	$0,45 \pm 0,08$	—	—

Примечание: * — установлено достоверное различие с уровнем значимости $P \leq 0,05$

Наряду с этим, продолжительное культивирование эксплантов сорта Ливадия на среде с 1,91 мг/л ТДЗ индуцировало появление меристемоидов. Так, на 120 сут культивирования было получено 11,0 меристемоидов/эксплант. Вместе с тем, через 6-7 месяцев в асептических условиях образовалось максимальное количество меристемоидов (40 шт.) размером от 0,1 до 0,7 см (Тевфик и др., 2014г). Результаты экспериментов показали, что применение 1,91 мг/л ТДЗ ингибировало последующую регенерацию этих меристемоидов. Поэтому для повышения уровня морфологического ответа отдельные меристемоиды и группы меристемоидов (по 2-3 шт.) переносили на среду МС, дополненную 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК.

Проведенные нами гистологические исследования позволили выявить некоторые особенности развития образующихся меристемоидов канны садовой. Результаты этой работы представлены на рисунке 4.4. Так, в процессе исследований было выявлено, что нам действительно удалось индуцировать образование меристемоидов у сорта Ливадия, у которого меристемоиды формируются из активно делящихся меристематических зон в основании микропобега. В некоторых случаях можно наблюдать дальнейшее развитие этих структур в виде меристемы побега и примордиальных листьев (рис. 4.4А). Отмечено также плотное прилегание друг к другу множественных адвентивных почек (рис. 4.4Б). Вместе с тем, можно наблюдать формирование трахеоподобных структур и скопления паренхимных клеток (рис. 4.4В).

У сорта Суевия наблюдали отдельные зоны, обладающие меристематической активностью, из которых формируются меристемоиды (рис. 4.4Д). У канны сортов Суевия и Ливадия происходил также другой тип дифференциации тканей – гистогенез (рис. 4.4Е). Клетки, образующиеся в основании микропобегов ‘Суевия’ неморфогенного каллуса (рис. 4.4Г), не были способны к дедифференциации. Среди каллусных формировались клетки паренхимного типа – крупные, вакуолизированные, с пристенным слоем цитоплазмы. Ядер в таких клетках не наблюдали. Кроме того, в таком каллусе отсутствовали сосудистые пучки и плазмодесмы (Тевфик и др., 2014б).

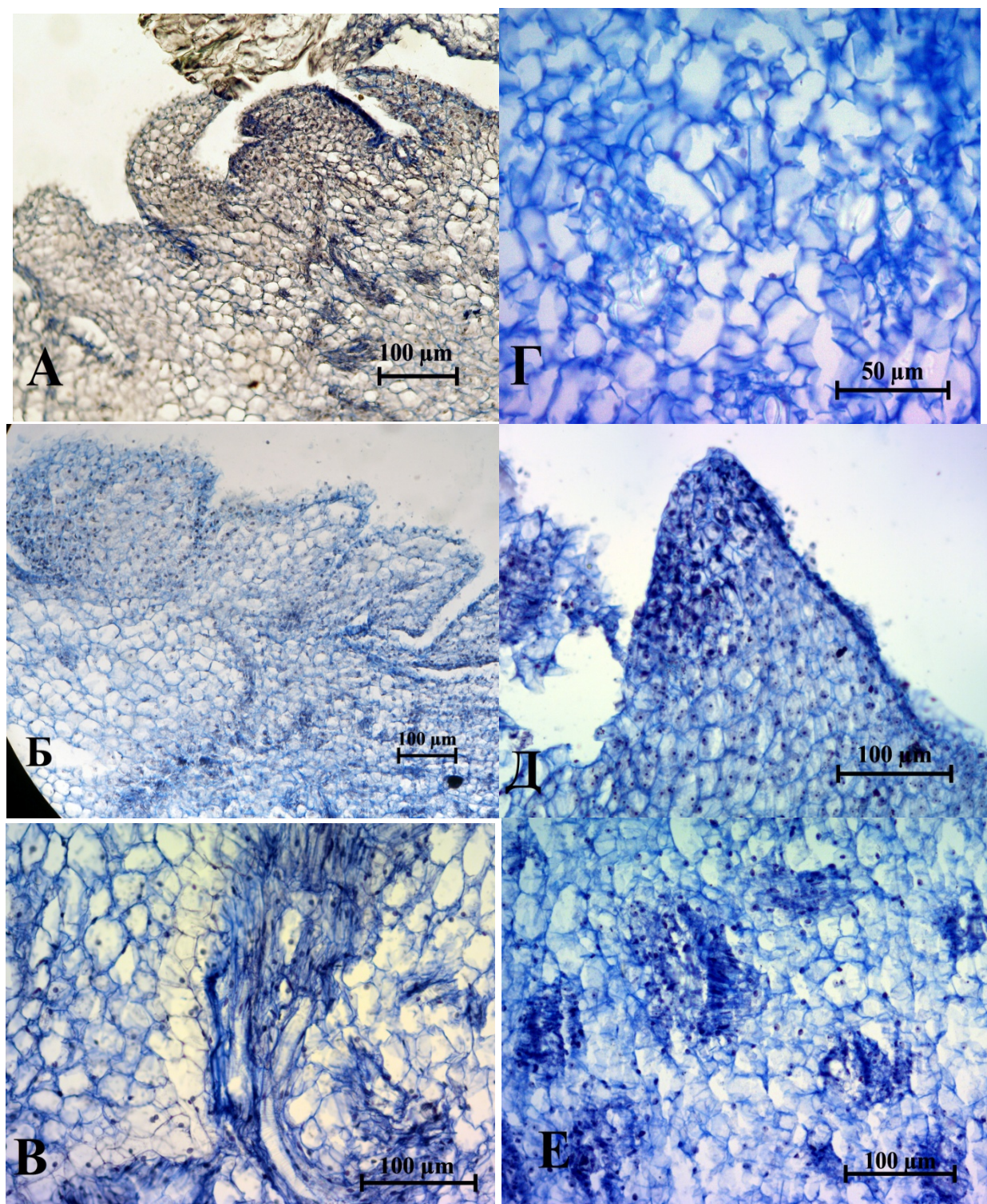


Рис. 4.4. Гистологические исследования органоге­не­за кан­ны са­довой:

- А) рас­кры­тие при­мор­ди­аль­ных ли­ст­ьев ме­ри­сте­мы по­бе­га сор­та Ли­ва­дия;
 Б) об­разо­ва­ние мно­же­ст­вен­ных ме­ри­сте­мо­идов сор­та Ли­ва­дия;
 В) ги­сто­ге­нез у сор­та Ли­ва­дия; Г) не­мор­фо­ген­ный кал­лус сор­та Суе­вия;
 Д) об­разо­ва­ние ме­ри­сте­мо­ида сор­та Суе­вия; Е) ги­сто­ге­нез у сор­та Суе­вия

Вместе с тем, гистологические исследования показали (Тевфик и др., 2014г), что в некоторых случаях при длительном беспересадочном культивировании на питательной среде МС с 2,55 мг/л ТДЗ образовавшиеся меристемоиды начинали отмирать (рис. 4.5).

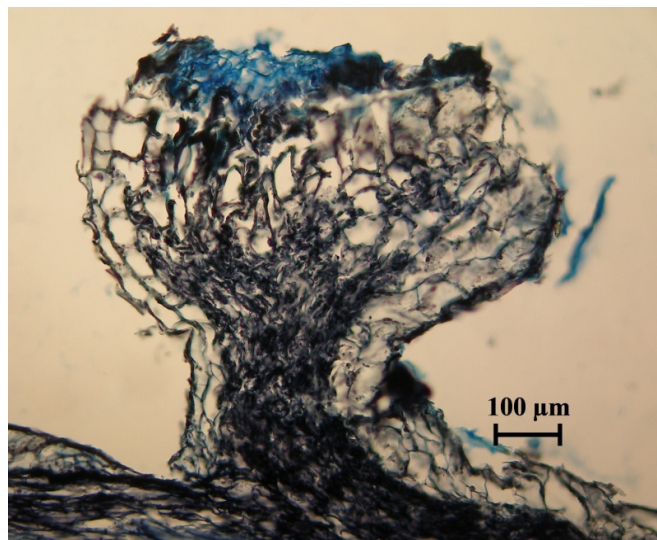


Рис. 4.5. Гистологические исследования отмирающего меристемоида сорта Ливадия, образовавшегося на питательной среде МС с 2,55 мг/л ТДЗ

Необходимо отметить, что после перенесения меристемоидов канны садовой, культивируемых на питательной среде, содержащей ТДЗ, на безгормональную питательную среду МС индуцировался процесс образования новых меристемоидов. Так, в основании меристемоидов сорта Суевия на 40-е сут культивирования формировалось до 4 меристемоидов на эксплант. Вместе с тем, образовавшиеся меристемоиды имели преимущественно бежевую окраску и были крупнее (длиной 0,5-0,6 см), по сравнению с полученными на питательной среде МС с ТДЗ (длиной 0,2-0,5 см). Однако, длительное культивирование не приводило к образованию новых меристемоидов, а меристемоиды, перенесенные на свежеприготовленную питательную среду через некоторое время темнели.

Наряду с этим, культивирование меристемоидов сорта Ливадия на безгормональной питательной среде МС способствовало образованию на 60-е

сут культивирования до 12 меристемоидов на эксплант. Дальнейшее их культивирование на данной среде индуцировало образование новых меристемоидов.

Для активизации регенерационных процессов меристемоиды помещали на ряд питательных сред: МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК; МС с 2,0-4,0 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃; WPM с 0,75 мг/л БАП.

Как показали наши исследования, увеличение некоторых меристемоидов и дальнейшее формирование вегетативных почек канны сорта Ливадия зависило от количества субкультивирований и используемой питательной среды. Так, у меристемоидов данного сорта (рис. 4.5; 4.6; В.1) через 85 сут культивирования на среде МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК после введения эксплантов и проведенных 5 пассажей, частота регенерации составила 24%; более 82% – после 9-го пассажа. Вместе с тем, больше всего регенерировавших меристемоидов сорта Ливадия сформировалось после 11 пассажей (88% — на 60 сут культивирования).

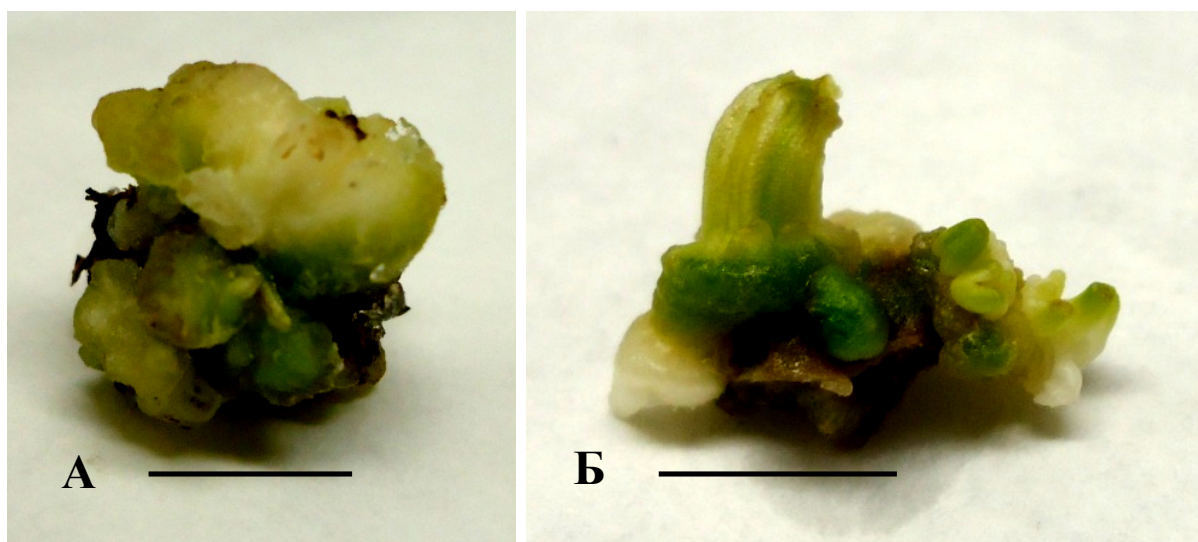


Рис. 4.5. Развитие меристемоидов канны садовой сорта Ливадия:

А) образование меристемоидов на питательной среде МС с 1,91 мг/л ТДЗ;

Б) регенерационные процессы на питательной среде МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК (масштаб 1 см)

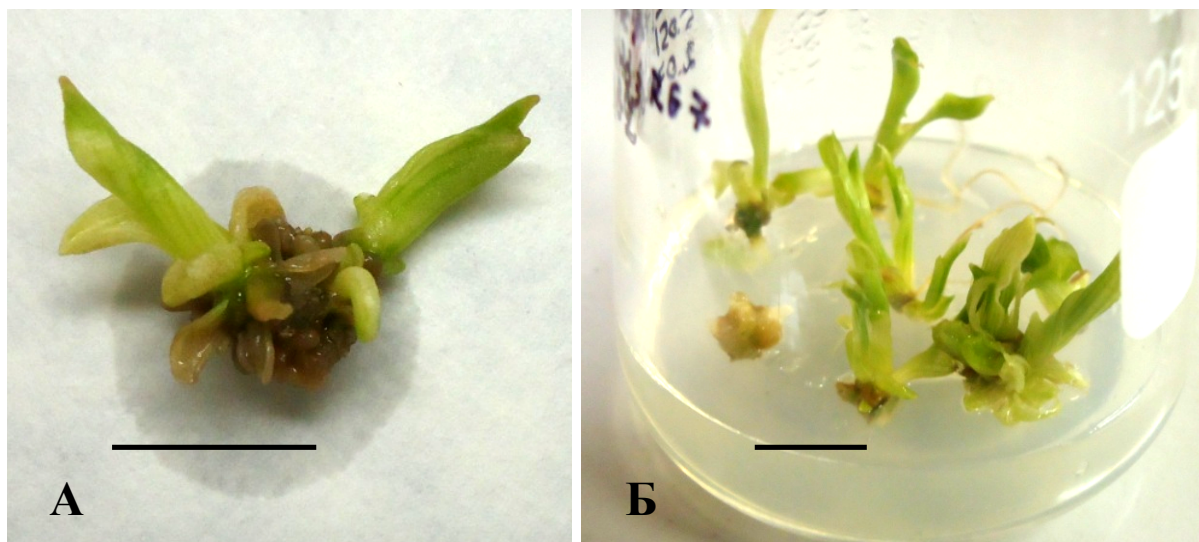


Рис. 4.6. Микропобеги, полученные из меристемоидов канны сорта Ливадия на питательной среде МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК: А) развитие микропобегов; Б) адвентивное побегообразование (масштаб 1 см)

Аналогичные результаты по повышению частоты регенерации с увеличением количества субкультивирований были получены при культивировании на питательной среде WPM с 0,75 мг/л БАП (рис. В.2). Однако на этой среде регенерировавшие меристемоиды начинали появляться на более раннем сроке культивирования и за счет этого частота регенерации на 8, 11, 13 пассаже была выше, чем за этот же период на среде МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК.

Изучение влияния количества пассажей и состава регуляторов роста в питательной среде МС на регенерационную способность меристемоидов канны садовой сорта Суевия показало, что количество образовавшихся вегетативных почек увеличивалось с длительностью культивирования и частотой пассажей.

Исследования показали, что культивирование на питательной среде МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК способствовало более раннему появлению меристемоидов, образующих вегетативные почки, а затем и микропобеги (рис. 4.7; рис. В.3). Так, через 12 субкультивирований на данной среде частота регенерации достигала 14% уже на 75 сут культивирования. На питательной среде МС с 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃ количество регенерировавших меристемоидов было не превышало 10% на 105 сут культивирования (рис. В.4).

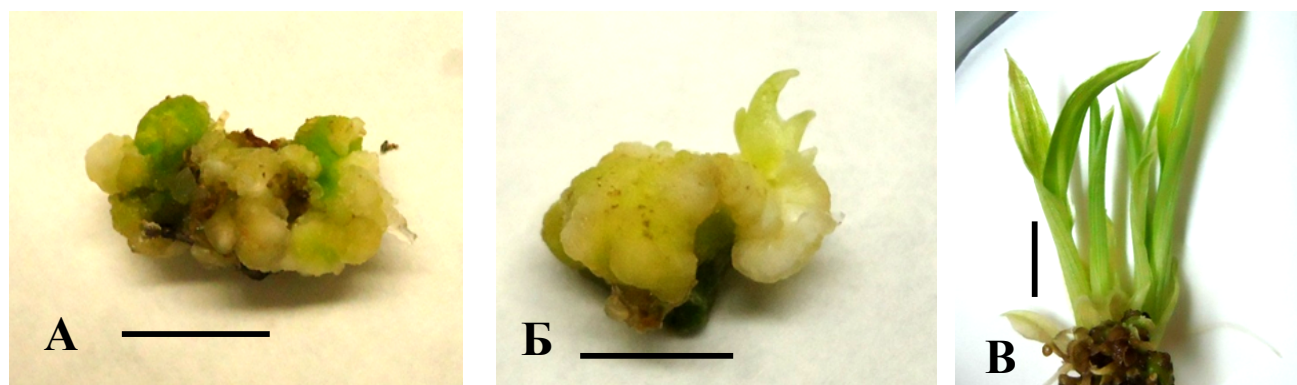


Рис. 4.7. Регенерация растений из меристемоидов канны садовой сорта Суевия:

- А) образование меристемоидов на питательной среде МС с 1,27 мг/л ТДЗ;
 Б) развитие вегетативных почек из меристемоидов на среде МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК; В) массовая регенерация растений на 15-е сут культивирования (масштаб 1 см)

Проведенные эксперименты также показали, что частота образования дополнительных меристемоидов достигала максимума на 75 сут культивирования через 15 пассажей на питательной среде МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК (95%) и на 120 сут культивирования – на среде МС с 2,0-4,0 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃ (91%). Однако во втором случае при отделении микропобегов и пассаже на аналогичную питательную среду отмечали увеличение частоты адвентивного побегообразования. Так, количество образовавшихся адвентивных побегов *de novo* через 7 сут после отделения и последующего культивирования на среде МС с 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃ было на уровне 2-3 шт. на микропобег, на среде МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК – 1-2 шт./микропобег. При длительном культивировании микропобегов увеличивалось их количество, длина и происходило разворачивание до 2 листьев на эксплант.

В ходе опытов наблюдали увеличение длины регенерировавших меристемоидов канны сортов Суевия и Ливадия из которых развивались вегетативные почки. При переносе на свежеприготовленную питательную среду через 7 сут культивирования индуцировался процесс адвентивного побегообразования (рис. 4.8). Вместе с тем, для сорта Ливадия было характерным формирование адвентивных побегов с последующим корнеобразованием.

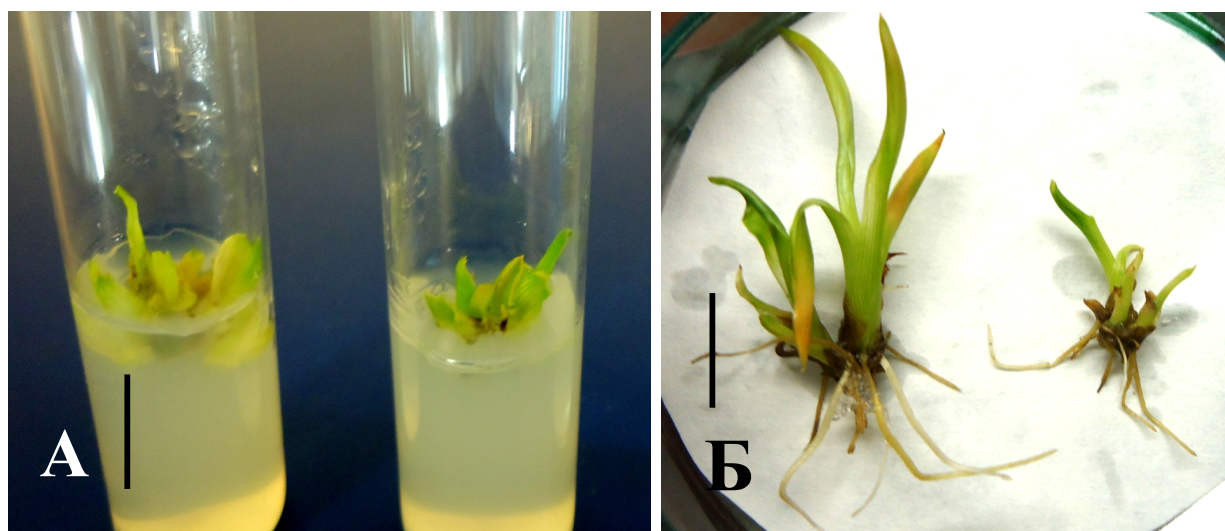


Рис. 4.8. Адвентивное побегообразование канны садовой: А) сорта Суевия на питательной среде МС с 4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃; Б) сорта Ливадия на питательной среде WPM с 0,75 мг/л БАП (масштаб 1 см)

Вместе с тем полученные микропобеги из меристемоидов обладали высокой частотой регенерации адвентивных микропобегов (100%) и по сравнению с введенными в условия *in vitro* вегетативными почками. Необходимо отметить, что, при использовании первичных эксплантов вегетативных почек интактного растения, количество образовавшихся адвентивных микропобегов не превышало 2 шт./эксплант. Используя полученные нами меристемоиды удалось значительно повысить коэффициент размножения, который составил в среднем 3,2-4,8 шт./эксплант (табл. 4.5).

Таблица 4.5

Влияние генотипа и состава питательной среды на количество образовавшихся микропобегов на эксплант, шт.

Генотип	Питательная среда, мг/л	Продолжительность культивирования, сутки			
		10	20	30	40
Суевия	МС с 2-4 БАП и 1 ГК ₃	1,4±0,27	2,2±0,22	2,6±0,27	4,8±0,22
	МС с 1,5 БАП и 1,5 ИУК	0,8±0,22	1,6±0,27	2,2±0,22	4,4±0,27
Ливадия	WPM с 0,75 БАП	0,6±0,27	1,2±0,22	1,8±0,22	4,0±0,35
	МС с 1,5 БАП и 1,5 ИУК	—	0,8±0,22	1,4±0,27	3,2±0,22

Исследования показали, что в основании микропобегов из меристемоидов сорта Ливадия и Суевия (рис. 4.7) на 40 сут культивирования образовалось до 4,0 и 4,8 адвентивных побегов на эксплант соответственно. Вместе с тем, сразу после этапа введения вегетативных почек в условия *in vitro* максимальное количество образовавшихся дополнительных побегов на эксплант было на уровне 2 шт./эксплант.

При культивировании экспланта сорта Президент (рис. 4.9) на питательной среде МС, дополненной 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК наблюдали разворачивание листьев. При этом, по сравнению с сортами канны Суевия и Дар Востока у этого сорта образования дополнительных побегов и корней не отмечали (Тевфик и др., 2014б).



Рис. 4.9. Развивающийся микропобег канны сорта Президент (масштаб 1 см)

Длительное культивирование микропобега канны 'Президент' на питательных средах с ТДЗ вызывало образование каллуса в его базальной части. Такой каллус после отделения и при последующем культивировании темнел и отмирал.

Таким образом, выявлено, что для активного адвентивного побегообразования при культивировании эксплантов сортов Ливадия необходимо добавление в питательную среду 1,91 мг/л ТДЗ. Вместе с тем, для сортов Дар Востока и Суевия оптимальной концентрацией ТДЗ является 1,27 мг/л. В результате гистологического анализа полученных нами морфогенных структур выявлено, что у канн садовой сортов Суевия и Ливадия формируются меристемоиды. Их количество можно значительно увеличить за счет частоты

пассажей и длительного культивирования на средах с 1,27 и 1,91 мг/л ТДЗ. Это позволило массово размножить *in vitro* сорта канны, включенных в эксперимент. Установлено, что для получения регенерантов из меристемоидов канны сорта Ливадия необходимо их переносить на питательные среды МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК или WPM с 0,75 мг/л БАП, сорта Суевия на среду МС с 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃ или МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК.

4.2. Индукция прорастания зрелых семян *in vivo*, незрелых и зрелых семян, изолированных зародышей в асептических условиях культивирования

Зрелые семена канны имеют черную окраску (рис. 4.10), отличаются очень твердой оболочкой, длительным и неравномерным периодом прорастания.



Рис. 4.10. Зрелые семена канны сорта Дар Востока, масштаб 1 см

Для ускорения появления всходов нередко прибегают к предпосевной обработке семян. Известно, что прорастание семян подземное, адмотивно-язычкового типа, начинается с удлинения узкой части зародыша, которая называется «шейкой». Базальный конец зародыша вместе с почечкой и корешком выталкивается через «зародышевую щель» из семенной кожуры. Автор отмечал, что главный корень рано останавливается в росте, образующиеся придаточные корни по структуре не отличаются от главного (Плиско, 1985).

В наших опытах были использованы следующие виды воздействия на семена канны сортов Дар Востока и Ливадия (от свободного опыления):

1) погружение в раствор серной кислоты на 60, 120 мин; 2) холодовая обработка при +5°C в течение 1 суток и последующее выдерживание в горячей воде (100°C) в течение 10 сек (термическая обработка); 3) надрез семенной кожуры скальпелем (скарификация).

В процессе изучения всхожести семян было выявлено, что семена канны садовой сорта Ливадия не прорастали как при применении предпосевной обработки семян, так и без нее. В таблице 4.6 представлены результаты по стратификации и скарификации семян сорта Дар Востока.

Таблица 4.6

**Частота прорастания (%) семян *in vivo* канны садовой сорта
Дар Востока (от свободного опыления) в зависимости от применяемой
предпосевной обработки и вида субстрата**

Виды обработки семян	Вид субстрата	Продолжительность культивирования, сут					
		7	14	21	28	35	42
Без обработки	перлит	—*	15,4	23,1	38,5	38,5	38,5
	стерильный почвенный субстрат	—	7,7	15,4	23,1	38,5	38,5
Скарификация скальпелем	перлит	7,7	23,1	30,7	46,2	46,2	46,2
	стерильный почвенный субстрат	—	—	15,4	23,1	30,7	30,7
Обработка серной кислотой (60 мин)	перлит	—	15,4	23,1	23,1	23,1	23,1
	стерильный почвенный субстрат	—	—	—	—	—	—
Обработка серной кислотой (120 мин)	перлит	—	7,7	15,4	15,4	23,1	23,1
	стерильный почвенный субстрат	—	—	—	—	—	—
Термическая обработка	перлит	—	—	—	—	—	—
	стерильный почвенный субстрат	—	—	—	—	—	—

Примечание: * — семена не прорастали

При высевании в перлит семян канны сорта Дар Востока, которые предварительно подвергали скарификации скальпелем, первые всходы начинали появляться на 7 сут культивирования (рис. 4.10). Спустя 28 сут культивирования частота прорастания семян составила 46,2%. Наряду с этим, на данный срок культивирования при высевании этих же семян в стерильный почвенный субстрат количество проросших семян было в 2 раза меньше (23,1%).

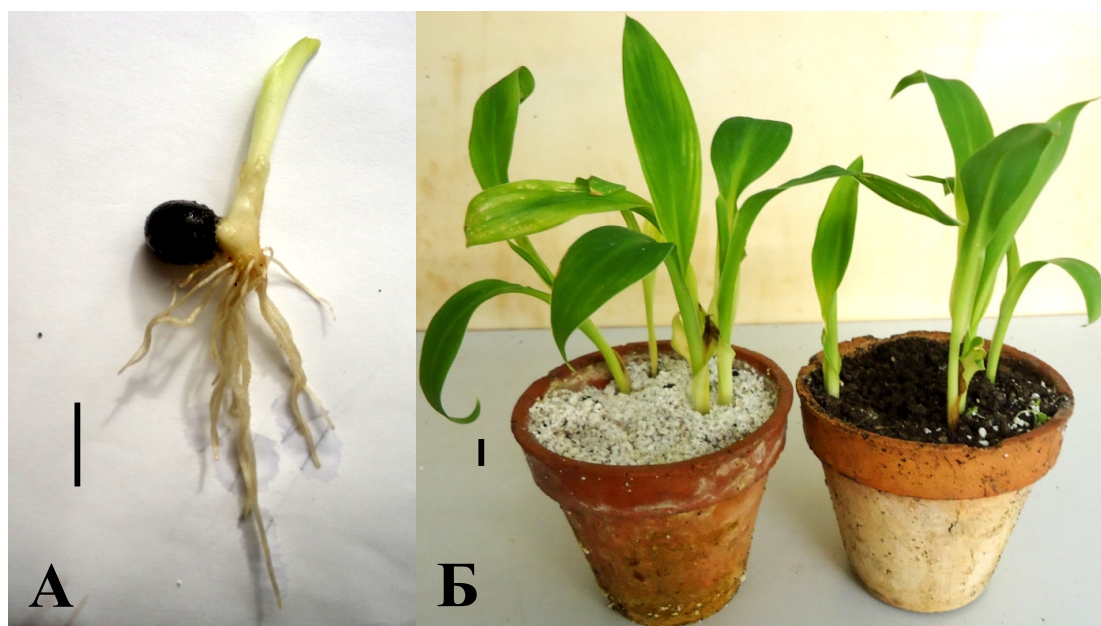


Рис. 4.10. Проросшие семена канны садовой сорта Дар Востока (от свободного опыления после скарификации: А) на 7 сут культивирования *in vivo*; Б) на 35 сут культивирования *in vivo*

Исследования показали, что семена, высаженные без предпосевной обработки, и семена, обработанные серной кислотой, начали всходить на 14 сут культивирования. Однако, при дальнейшем культивировании *in vivo* у семян после обработки серной кислотой в течение 60 мин отметили низкую частоту прорастания семян (23,1%). Вместе с тем, высаженные аналогичные семена в почвенный субстрат не прорастали и инфицировались. Наряду с этим, семена без обработки имели высокую частоту прорастания как при высевании в перлит, так и в почвенный субстрат (38,5%). Также было выявлено, что семена

канны садовой сорта Дар Востока после термической обработки не обладали всхожестью (Тевфик и др., 2014в).

Для индукции различных путей морфогенеза *in vitro* нами использованы в качестве первичных эксплантов недозрелые семена. Как показали результаты, жизнеспособность культивируемых эксплантов зависила от состава питательной среды (табл. Г.1). Для поддержания жизнеспособности эксплантов сорта Дар Востока (от свободного опыления) на 21-е сут культивирования оптимальной оказалась питательная среда RG4 (МС + 1,27 мг/л ТДЗ). При этом, на данной среде отмечали появление набухших семян у 64% жизнеспособных незрелых семян.

У сорта канны садовой Ливадия (от свободного опыления) (рис. Г.1, А) спустя 3 недели культивирования *in vitro* больше всего жизнеспособных эксплантов (53-64%) было получено на питательной среде МС + 2 мг/л БАП + 1,75-2 мг/л ИУК. Вместе с тем, количество набухших семян достигало 81,8% и 64,7% на средах RG2 и RG3, соответственно.

Наряду с этим, у сортов Президент и Суевия (от свободного опыления) на 21-е сутки культивирования отмечена низкая жизнеспособность эксплантов на всех использованных питательных средах. На среде RG3 у сорта Президент (рис. Г.1, Б) удалось получить набухшие семена.

Для индукции прорастания семян были использованы в качестве эксплантов недозрелые и зрелые семена. В процессе исследования часть незрелых семян размером 0,1-0,2 см (рис. Г.2, А) на 14 сут культивирования теряли жизнеспособность. При этом, на питательной среде Монье было получено большее количество жизнеспособных эксплантов (табл. Г.2). Так, у сорта Дар Востока (от свободного опыления) в условиях пониженной положительной температуры отмечена жизнеспособность недозрелых семян на питательной среде Монье на уровне 80%, а на среде Мурасиге и Скуга – 34%.

У сортов Ливадия и Суевия (от свободного опыления) при температуре +5°C спустя 2 недели культивирования количество жизнеспособных эксплантов на питательной среде Монье составило 75 и 60%, на среде Мурасиге и Скуга –

17 и 50%, соответственно. Экспланты сорта Президент обладали низкой жизнеспособностью (25%).

Наши исследования показали, что жизнеспособность эксплантов (семян) канны садовой зависит от их размера, условий культивирования и состава питательной среды. Так, все крупные семена у сорта Дар Востока на 14-е сут культивирования оказались жизнеспособными (рис. Г.2, Б). На протяжении последующих 7 сут семена, культивируемые при освещении и на питательной среде Монье изменили окраску от бежевой до зеленой.

Экспланты, помещенные на питательную среду МС при освещении и без него, на 21-е сут культивирования не поменяли окраску. Отмечена 100% жизнеспособность эксплантов на 60 сут после стратификации и последующего культивирования. Наряду с этим, изменение окраски от бежевой до зеленой в этих условиях отмечали на 37-е сут культивирования. В дальнейшем происходило потемнение и постепенное отмирание эксплантов (Тевфик и др., 2013; Тевфик, Митрофанова, 2013б). Возможно, это связано с тем, что семена канны имеют склерифицированную семенную кожуру, препятствующую прорастанию зиготического зародыша. Для преодоления трудности прораствания семян нами был использован метод эмбриокультуры.

В процессе исследований было отмечено, что большинство сортов канны садовой формируют недоразвитые зародыши. При этом культивирование *in vitro* изолированных зародышей позволяет получить полноценные растения. Для индукции прораствания зародышей их стратифицировали культивированием в условиях пониженной положительной температуры и отсутствия освещения на питательной среде Монье в течение 60 сут.

У изолированных из семени зародышей канны сорта Дар Востока на 8-е сут культивирования наблюдали разраствание тканей. На 14-е сут культивирования длина и толщина зародыша увеличились на 0,5 и 0,36 см, соответственно (табл. 4.7). Последующее культивирование экспланта способствовало менее интенсивному разрастванию тканей зародыша (0,16 и 0,08 см), чем за первые 6 суток с момента увеличения в размере изолированного зиготического зародыша.

**Разрастание тканей изолированных зародышей сорта Дар Востока (от
свободного опыления) в зависимости от продолжительности
культивирования**

Характеристика зародыша	Исходный размер	Продолжительность культивирования, сутки		
		14	25	35
Длина, см	0,58±0,08	1,08±0,03*	1,24±0,05	1,40±0,04
Ширина, см	0,22±0,04	0,58±0,08*	0,66±0,04	0,67±0,05

Примечание:* – установлено достоверное различие с уровнем значимости $P \leq 0,05$

В процессе исследования на поверхности зародыша формировался каллус двух типов: плотный и рыхлый. На 30 сутки культивирования размер каллуса увеличивался (рис. 4.11, А). Наряду с этим, у некоторых изолированных зародышей на 21-е сут культивирования развивались корни (1-4 шт./эксплант). Частота ризогенеза у таких эксплантов достигала 25% (Тевфик и др., 2013). На 50-е сутки культивирования длина корней составила $0,73 \pm 0,06$ см (рис. 4.11, Б). У отдельных зародышей после стратификации и помещения в стандартные условия культивирования отметили потемнение корней.

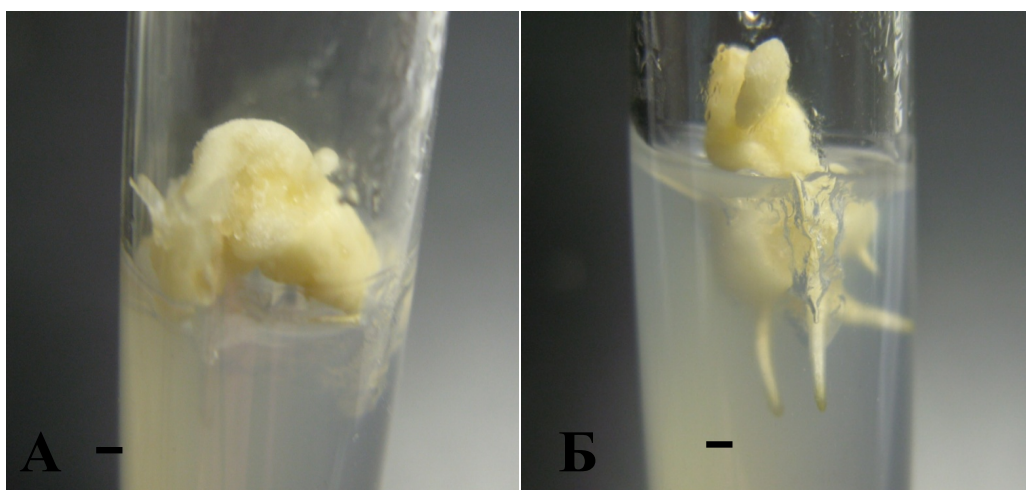


Рис. 4.11. Зародыши канны садовой сорта Дар Востока (от свободного опыления) на 30-е сутки культивирования в условиях стратификации:
А) формирование плотного и рыхлого каллуса на поверхности экспланта;
Б) образование корней у зародыша (масштаб 1 мм)

Результаты гистологических исследований зародышей сорта Дар Востока показали, что на 30-е сут культивирования в условиях стратификации происходит закладка трех корней (рис. 4.12, А). На 60-е сут культивирования происходит раскрытие первого настоящего листа (рис. 4.12, Б). Наряду с нормальным развитием зародыша в условиях *in vitro* в тканях семядоли недоразвитого зиготического зародыша отмечали формирование соматического зародыша (рис. 4.13) (Тевфик и др., 2014). Массового образования соматических эмбриоидов нами не было отмечено. Вместе с тем ткани семядоли зародышей сортов Дар Востока и Ливадия содержали большое количество крахмальных зерен (рис. Д.1; Д.2).

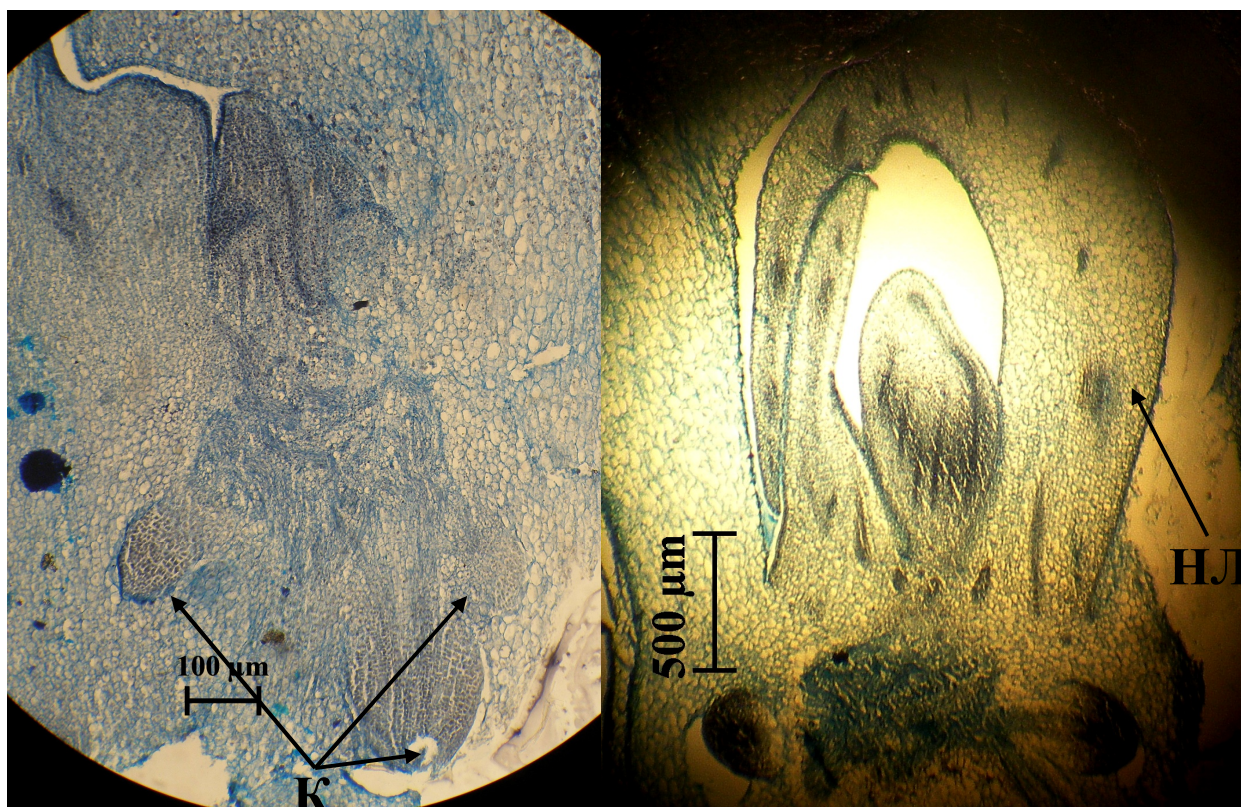


Рис. 4.12. Гистологические исследования развития изолированного зародыша канн сорта Дар Востока (от свободного опыления) при культивировании в условиях стратификации: А) на 30-е сут; Б) на 60-е сут.

Примечания: К – корень, НЛ – настоящий лист

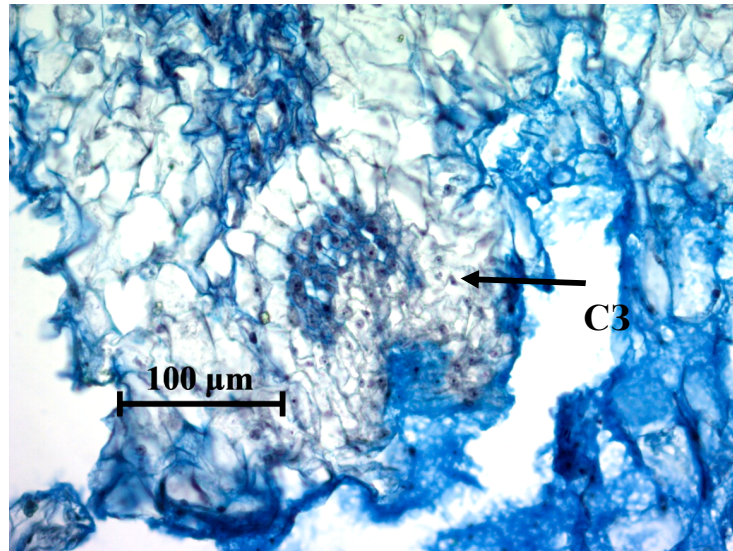


Рис. 4.13. Гистологическое исследование образования соматического зародыша (СЗ) в тканях семядоли канн садовой сорта Дар Востока (от свободного опыления)

Изолированные зародыши с образовавшимися корнями спустя 2 месяца культивирования в темноте при $+5^{\circ}\text{C}$ переносили в стандартные условия (температура $+24\pm 1^{\circ}\text{C}$, 16-часовой фотопериод и интенсивность освещения 2-3 клк). Результаты экспериментов показали, что на 2-е сутки культивирования при освещении экспланты изменили свою окраску с бежевой на зеленую. Вместе с тем, на 6-8 сутки культивирования в культуральной комнате у зародышей канн сорта Дар Востока наблюдали выдвижение первого листа (рис. 4.14, А). При этом, на 10-е сутки культивирования длина листа составила $2,5\pm 0,61$ см (Митрофанова и др., 2014). На 15-е сутки культивирования количество листьев у экспланта увеличивалось от 2 до 3 шт. (рис. 4.14, Б).

В процессе исследований у проростков канн садовой, развившихся из зародышей в стандартных условиях культивирования, отмечали увеличение количества и длины корней. Так, у некоторых эксплантов сорта Дар Востока на 10-е сутки культивирования количество корней на эксплант увеличилось до $8,2\pm 1,78$ шт. Длина корней на данный срок культивирования составила $2,04\pm 0,23$ см (табл. 4.8).

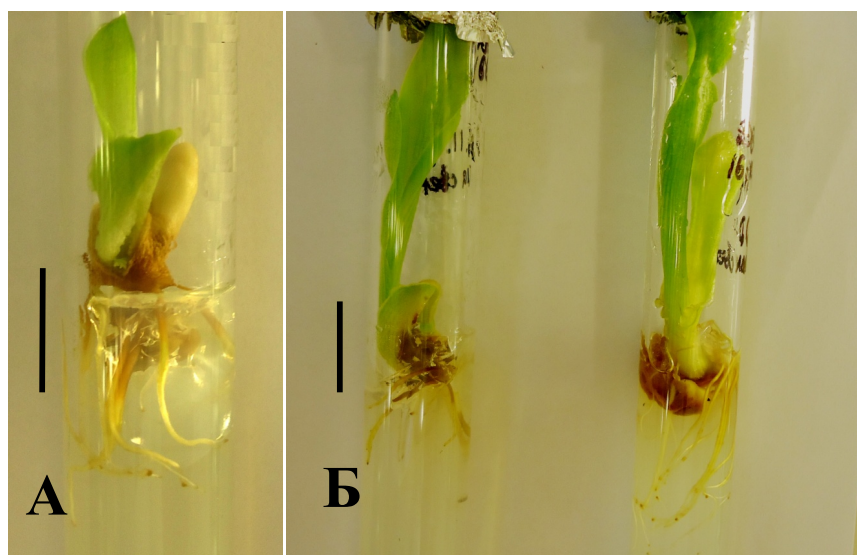


Рис. 4.14. Появление листьев у зародышей канны садовой сорта Дар Востока (от свободного опыления) при культивировании в стандартных условиях:

А) на 6-8 сутки; Б) на 15-е сутки (масштаб 1 см)

Таблица 4.8

Морфологические признаки изолированных зародышей сорта Дар Востока (от свободного опыления) при культивировании *in vitro*

Морфологические признаки	Культивирование в условиях стратификации (60 сут)	Срок культивирования в стандартных условиях	
		10-е сут (контроль)	35-е сут
Среднее количество корней, шт.	$2,57 \pm 0,52$	$8,02 \pm 1,78$	$11,33 \pm 0,41$
Средняя длина корней, см	$0,45 \pm 0,09$	$2,04 \pm 0,23$	$3,80 \pm 0,14^*$
Среднее количество листьев, шт.	—	$1,20 \pm 0,22$	$2,50 \pm 0,33^*$
Средняя длина листьев, см	—	$2,50 \pm 0,61$	$8,75 \pm 0,37^*$

Примечание: * — установлено достоверное различие с уровнем значимости $P \leq 0,05$

В ходе опытов было выявлено, что изолированные зародыши сорта Ливадия (от свободного опыления) обладали низкой частотой прорастания (50%) по сравнению с сортом Дар Востока (100%). На 30-36 сут культивирования в стандартных условиях зародыша 'Ливадия' происходило формирование глобулярных структур. При последующем культивировании отметили увеличение их количества и размеров (рис. 4.15). Наряду с этим, жизнеспособные разросшиеся части каллуса и глобулярные структуры, сформировавшиеся из изолированного зародыша 'Ливадия', изменили окраску с бежевой на светло-зеленую.

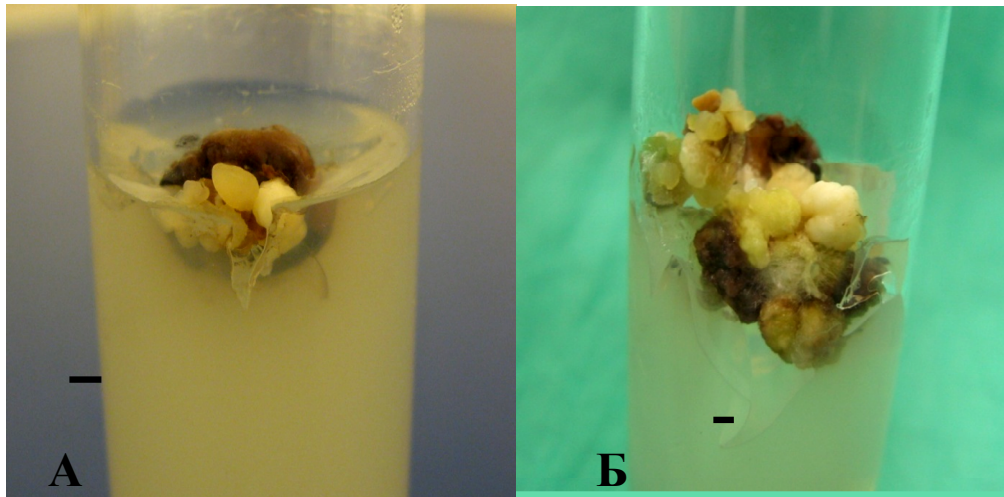


Рис. 4.15. Глобулярные и эмбриоподобные структуры у сорта Ливадия (от свободного опыления): А) на 36-е сутки культивирования в стандартных условиях; Б) на 50-е сутки (масштаб 1мм)

Однако, при более длительном культивировании наблюдали потемнение и постепенное отмирание глобулярных структур (Тевфик, Митрофанова, 2014). Возможно для регенерации микропобегов из полученных структур необходим более тщательный подбор регуляторов роста и физических факторов культивирования. При этом, результаты экспериментов показали, что из изолированного зародыша сорта Ливадия при перенесении в стандартные условия культивирования кроме формирования глобулярных структур развивались полноценные проростки (рис. 4.16).

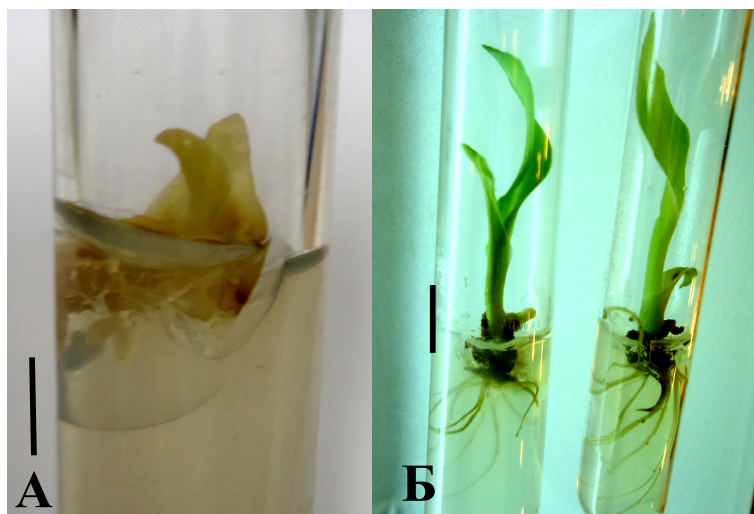


Рис. 4.16. Развитие зародышей сорта Ливадия (от свободного опыления) при культивировании в стандартных условиях: А) на 5 сут; Б) на 20 сут

Проведенные исследования показали, что после стратификации зародышей на 35-е сут культивирования в стандартных условиях развились полноценные проростки сорта Дар Востока и Ливадия (от свободного опыления). При этом, они имели хорошо развитые корни (до 11 шт./эксплант) и 2-3 развернувшихся листа. Наряду с этим, в тканях семядоли зиготического зародыша канны садовой нами был отмечен еще один путь морфогенеза *in vitro* – соматический эмбриогенез.

4.3. Выявление морфогенетического потенциала высечек листа и сегментов бутонов и завязи

В наших опытах жизнеспособность сегментов листьев, отобранных из условий *in vivo* и *in situ*, на различных питательных средах зависела от происхождения листового экспланта. Так, сегменты листового черешка, выращиваемых *in situ* растений, сохраняли жизнеспособность в условиях *in vitro* дольше, чем высечки из листовой пластинки (Тевфик, Митрофанова, 2013б).

Количество жизнеспособных листовых высечек, отобранных *in situ*, зависило также от состава питательной среды и продолжительности культивирования. Так, для сорта Дар Востока (табл. 4.9) оптимальными питательными средами оказались RG3, RG4 и RG5, на которых отмечали жизнеспособность эксплантов на уровне 75-100%. У сорта Ливадия жизнеспособность эксплантов на 21-е сутки культивирования составила 50% на средах RG2 и RG5. Вместе с тем, высокую жизнеспособность эксплантов у сорта канны Президент отмечали на средах RG1 и RG5. При этом, жизнеспособность высечек листа ‘Суевия’ на уровне 75% была получена на модифицированной среде МС с добавлением 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК.

Вместе с тем, наши исследования показали, что жизнеспособность эксплантов (высечек листа) растений сорта Суевия (рис. 4.17; Г.3), регенерировавших в условиях *in vitro*, на 14 сут культивирования зависит от режима освещения и состава питательной среды (Тевфік, Митрофанова, 2012).

Жизнеспособность листовых эксплантов, отобранных *in situ*, в зависимости от содержания регуляторов роста в питательной среде, %

Сорт	Срок культивирования, сут	Питательные среды, мг/л				
		RG1 (1,5 БАП+ 1,5 НУК)	RG2 (1,5 БАП+ 1,5 ИУК)	RG3 (2 БАП+ 1,75 НУК)	RG4 (2 БАП+ 1,75 ИУК)	RG5 (2 БАП+ 2 ИУК)
Дар Востока	7	50±6,1	75±10,2	100	100	100
	21	0	50±5,2	75±8,2	100	100
Ливадия	7	25±2,8	100	67±7,1	100	50±6,1
	21	0	50±4,5	25±3,0	50±6,1	25±2,2
Президент	7	100	50±4,5	50±5,6	50±5,9	100
	21	100	25±2,3	25±3,1	25±3,0	75±8,1
Суевия	7	50±4,8	100	50±5,8	50±5,9	100
	21	25±2,8	75±9,2	25±3,5	25±2,3	25±3,1

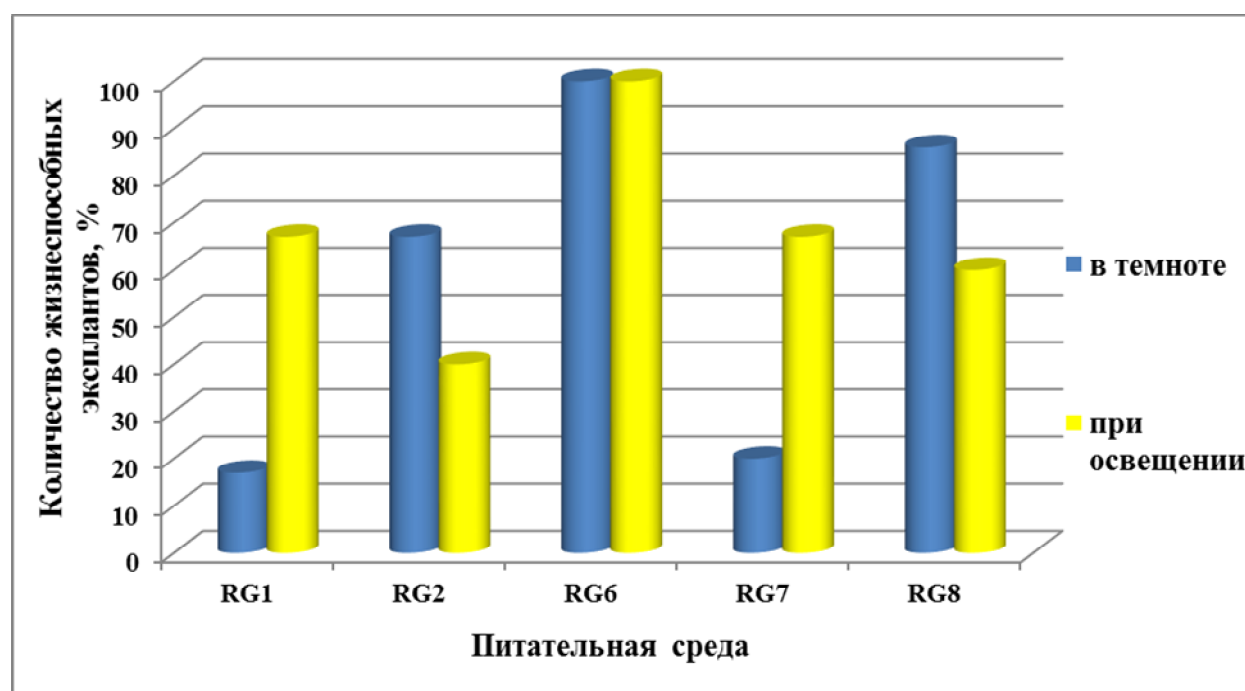


Рис. 4.17. Жизнеспособность высечек листа (%) сорта канны Суевия на 14-е сутки культивирования в зависимости от режима освещения и концентраций регуляторов роста в питательной среде МС: RG1 – 1,5 мг/л БАП + 1,5 мг/л НУК; RG2 – 1,5 мг/л БАП + 1,5 мг/л ИУК; RG6 – 1,5 мг/л 2,4-Д; RG7 – 1,27 мг/л ТДЗ; RG8 – 1,91 мг/л ТДЗ

Так, оптимальной средой для культивирования эксплантов как в темноте, так и на свету оказалась питательная среда, дополненная 1,5 мг/л 2,4-Д. Наряду с этим, высокая жизнеспособность эксплантов отмечена нами при культивировании без освещения на среде с добавлением 1,91 мг/л ТДЗ (86%). Однако, при культивировании в термостате на питательных средах с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК, 1,27 мг/л ТДЗ и на свету на 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК жизнеспособность эксплантов была низкой (17-40%). В этих условиях значительная часть эксплантов на 21 сутки культивирования темнела и погибала (рис. Г.3, Б).

В ходе экспериментов было выявлено, что при культивировании сегментов завязи и бутонов канны на 20-е сутки отмечали разрастание тканей (табл. 4.10; рис. Г.4, А). Однако, более длительное культивирование (более 35 сут) не позволило получить морфогенного ответа.

Таблица 4.10

Разрастание тканей сегментов завязи и бутонов канны садовой на 20 сут культивирования в зависимости от генотипа и состава питательной среды

Тип экспланта	Питательная среда	Сорт	Разрастание тканей*
Сегменты завязи	МС + 1,82 мг/л БАП + 0,91 мг/л ИУК	Дар Востока	—
		Президент	+
	МС + 1,0 мг/л 2,4-Д + 0,25 мг/л БАП	Дар Востока	—
		Президент	+
	МС + 1,0 мг/л 2,4-Д + 0,25 мг/л кинетина	Дар Востока	+
		Президент	—
	МС + 1,0 мг/л БАП + 1,0 мг/л ИУК	Дар Востока	+
		Президент	+
Сегменты бутонов	МС + 1,82 мг/л БАП + 0,56 мг/л ИУК	Дар Востока	+
		Президент	—
	МС + 4,0 мг/л БАП	Дар Востока	—
		Президент	—
	МС + 1,0 мг/л 2,4-Д + 0,25 мг/л кинетина	Дар Востока	+
		Президент	—
	МС + 1,0 мг/л БАП + 1,0 мг/л ИУК	Дар Востока	—
		Президент	—

Примечания: *+ разрастание тканей отмечено; — разрастание тканей не отмечено

Как показали наши исследования, разрастание тканей сегментов завязи наблюдали у сорта Президент почти во всех вариантах используемых питательных сред. Вместе с тем, сегменты бутонов разрастались только у сорта Дар Востока.

Таким образом, в процессе проведенных исследований были установлены эффективные концентрации регулятора роста цитокининного типа действия ТДЗ (1,27 и 1,91 мг/л), индуцирующие морфогенез *in vitro* в культуре вегетативных почек канны садовой. Изучена особенность формирования меристематидов у различных сортов канны садовой через геммогенез. Показаны последовательные этапы регенерации меристематидов и выявлена зависимость частоты их формирования от концентрации регуляторов роста, продолжительности культивирования и генотипа. Отмечено, что необходимым условием прорастания зиготических зародышей *in vitro* является стратификация в течение 60 сут культивирования. Продемонстрировано, что одним из путей реализации морфогенетического потенциала семядолей зиготического зародыша является соматический эмбриогенез. Установлено, что высечки листа, сегменты завязи и бутона, зрелые и незрелые семена имели низкую способность к морфогенезу *in vitro* и теряли свою жизнеспособность в течение 60 сут культивирования.

РАЗДЕЛ 5

УКОРЕНЕНИЕ МИКРОПОБЕГОВ *IN VITRO* И АДАПТАЦИЯ РЕГЕНЕРАНТОВ КАННЫ САДОВОЙ К УСЛОВИЯМ *IN VIVO*

5.1. Ризогенез у микропобегов *in vitro*

Завершающим этапом клонального микроразмножения растений является укоренение, полученных *in vitro* микропобегов. Для индукции образования и развития корней необходимо добавление в питательные среды веществ ауксинового типа действия: НУК, ИУК и ИМК (Бутенко, 1964; Калинин и др., 1980, 1992; Катаева, 1983; Сельскохозяйственная биотехнология, 1998; Корзина, 2009).

Как показали наши исследования некоторые экспланты канны садовой сорта Суевия способны к спонтанному корнеобразованию. Так, при культивировании микропобегов данного сорта на питательной среде, содержащей 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃, используемой нами для введения вегетативных почек, отмечали формирование спонтаннообразующихся корней на 37-е сут культивирования (рис. 5.1).



Рис. 5.1. Спонтанное корнеобразование канны садовой сорта Суевия на 120 сут культивирования на питательной среде МС, содержащей 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃

В результате экспериментов было выявлено, что средняя длина спонтаннообразующихся корней в основании микропобегов на 94-е сут культивирования регенерантов в асептических условиях составила 1,17 см. На 145 сутки культивирования в условиях *in vitro* их длина достигла 3,7 см (рис. 5.2). Вместе с тем, увеличивалось количество образовавшихся корней (до 3,3 шт./эксплант) (Тевфик, Митрофанова, 2012; Тевфик и др., 2014а).

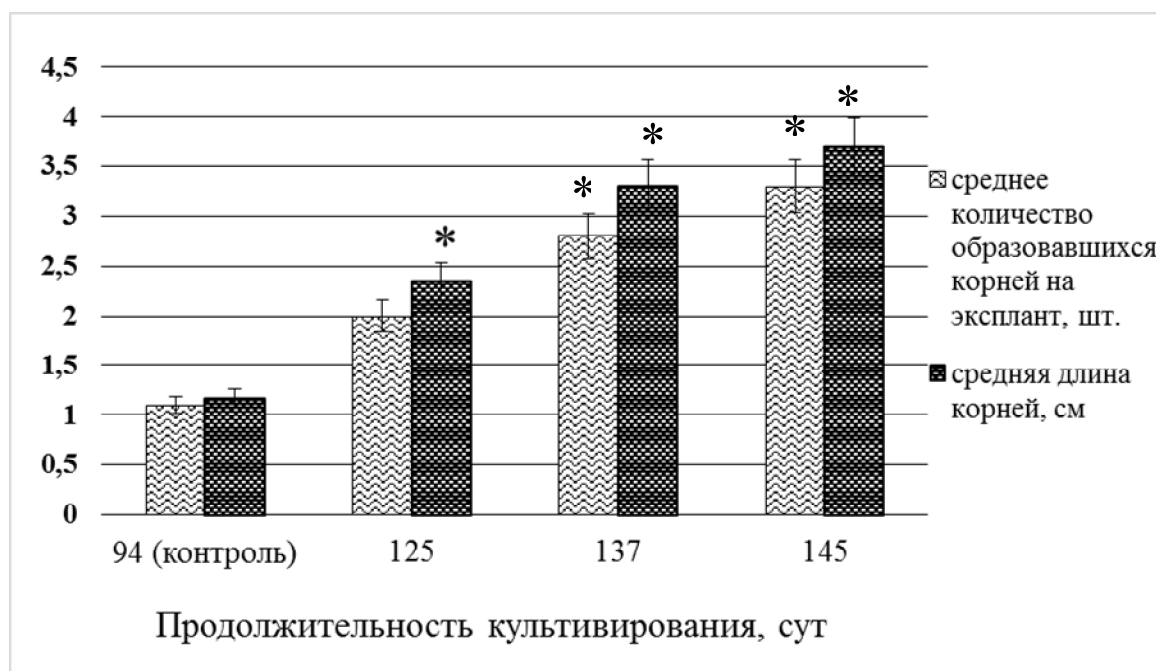


Рис. 5.2. Изменение количества и длины спонтаннообразующихся корней эксплантов сорта Суевия при культивировании *in vitro*; * – установлены достоверные различия по сравнению с контролем при уровне значимости $P \leq 0,05$

Наряду с этим, при культивировании сортов канны садовой Дар Востока, Ливадия и Президент на среде, содержащей 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃ не происходило спонтанного укоренения микропобегов. Поэтому для индукции корнеобразования микропобегов этих сортов их помещали на питательную среду с ауксинами ИУК и НУК.

В процессе проведения экспериментов было выявлено, что на среде, используемой нами для адвентивного побегообразования, также происходил

ризогенез, что в последующем позволило нам исключить специальный этап укоренения микропобегов, объединив этап собственно регенерации с этапом корнеобразования. Так, у сортов канны садовой Суевия и Дар Востока на 15-е сутки культивирования на модифицированной питательной среде МС, дополненной 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК отмечали образование корней (рис. 5.3, А). При последующем культивировании наблюдали активный рост корешков первого порядка, а также образование корешков второго порядка. Так, на 60-е сут культивирования на данной среде отмечали образование в среднем 5,0–6,25 корней длиной до 8 см (Митрофанова и др., 2014; Тевфик и др., 2014а).

В ходе опытов было выявлено, что культивирование микропобегов сорта Суевия (рис. 5.3, Б) на питательной среде Пирика с 0,5 мг/л кинетина и 1,0 мг/л НУК позволило индуцировать активное корнеобразование (6,5 шт./эксплант) на 60 сут культивирования (табл. 5.1). При более длительном культивировании в основании микропобегов образовывалось 6 корней. Полноценные регенеранты с хорошо развитыми корнями у сорта Дар Востока были получены спустя 3 месяца культивирования (рис. 5.3, В).

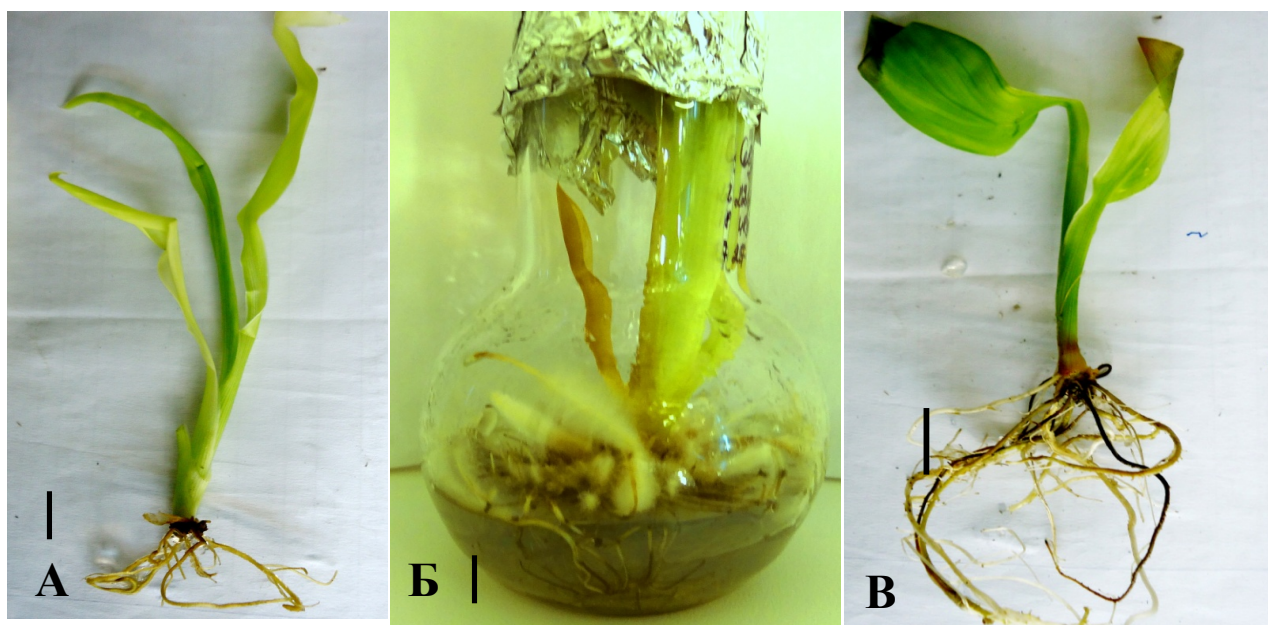


Рис. 5.3. Укоренение микропобегов канны садовой: А) сорта Суевия на питательной среде Пирика, дополненной 0,5 мг/л кинетина и 1,0 мг/л НУК; Б) сорта Суевия на среде МС, дополненной 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК; В) сорта Дар Востока на питательной среде Пирика с 0,5 мг/л кинетина и 1,0 мг/л НУК (масштаб 1 см)

**Влияние продолжительности культивирования и питательной среды
на образование корней в основании микропобегов канны садовой**

Продолжи- тельность культиви- рования, сутки	Питательная среда	Суевия		Дар Востока	
		Среднее к-во образовав- шихся корней/ эксплант, шт.	Средняя длина корней, см	Среднее к-во образовав- шихся корней/ эксплант шт.	Средняя длина корней, см
30 (контроль)	МС + 1,5 мг/л БАП + 1,5 мг/л ИУК	1,75±0,29	2,00±0,71	3,00±0,47	2,70±0,24
	Пирика + 0,5 мг/л кинетина + 1,0 мг/л НУК	3,00±0,81	2,81±0,61	1,50±0,33	0,73±0,17
60	МС + 1,5 мг/л БАП + 1,5 мг/л ИУК	6,25±1,19*	3,56±0,41	5,00±0,47*	7,43±0,99*
	Пирика + 0,5 мг/л кинетина + 1,0 мг/л НУК	6,50±1,00*	6,16±0,95*	2,25±0,29	3,00±0,35*
90	МС + 1,5 мг/л БАП + 1,5 мг/л ИУК	—	—	—	—
	Пирика + 0,5 мг/л кинетина + 1,0 мг/л НУК	—	—	6,00±0,47*	3,28±0,49*

Примечание: — при данном сроке культивирования высаживали на адаптацию;

* — установлены достоверные различия при уровне значимости $P \leq 0,05$

Результаты исследований показали, что при культивировании канны садовой сорта Ливадия на среде МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК не наблюдали активного корнеобразования по сравнению с сортами Дар Востока и Суевия. Однако, на 38 сут культивирования у некоторых микропобегов сорта Ливадия отмечали образование единичных корней. Вместе с тем, при продолжительном культивировании микропобегов сорта Ливадия на питательных средах МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК и WPM с 0,75 мг/л БАП для собственно микроразмножения были получены регенеранты, пригодные к высадке на адаптацию *in vivo* (табл. 5.2, рис. 5.4).

**Укоренение микропобегов канны сорта Ливадия на 120 сут
культивирования в зависимости от состава питательной среды**

Питательная среда	Среднее количество образовавшихся корней/эксплант, шт.	Средняя длина корней, см
МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК	6,0±0,61	4,0±0,63
WPM с 0,75 мг/л БАП	3,2±0,34	2,7±0,44

В ходе опытов выявлено, что культивирование микропобегов канны сорта Ливадия на питательной среде МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК (рис. 5.4) индуцировало образование большего числа корней на эксплант (6 шт.) длиной 4 см, но сформированные корни были тонкими по сравнению с образовавшимися на среде WPM с 0,75 мг/л БАП (3,2 шт./эксплант, 2,7 см).



Рис. 5.4. Регенеранты канны садовой сорта Ливадия
на питательной среде МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК на 120 сут
культивирования (масштаб 1 см)

5.2. Адаптация регенерантов *in vivo*

Одним из наиболее сложных этапов клонального микроразмножения является последующая адаптация регенерантов к условиям *in vivo*. Это связано с тем, что растения подвергаются сильному стрессу в результате смены искусственных условий культивирования (постоянные влажность, температура, фотопериод, асептика) на естественные. Негативные последствия стресса в дальнейшем могут привести к гибели растений или проявиться в течение нескольких месяцев (Трушечкин и др., 1988; Barra, Mogollon, 2007; Cha-um et al., 2007; Assis et al., 2009). Для повышения жизнеспособности растений при адаптации *in vivo* необходимо подобрать два основных фактора: оптимальные субстрат для высадки пробирочных растений и условия культивирования.

Подбор компонентного состава субстратов для канн садовой осуществляли опытным путем. В качестве компонентов субстратов использовали песок, перлит, верховой торф и стерильный почвенный субстрат. Для поддержания 100% относительной влажности воздуха в качестве изоляторов использовали полиэтиленовую пленку и стеклянные банки (рис. 5.5).



Рис. 5.5. Пробирочные растения канн садовой, высаженные на адаптацию и накрытые изоляторами

На примере сорта Суевия, в процессе исследований было выявлено, что количество успешно адаптированных регенерантов к условиям *in vivo* зависит от применяемого нами субстрата (табл. 5.3).

Таблица 5.3

Приживаемость регенерантов канны садовой сорта Суевия в зависимости от состава почвенной смеси на 6 месяц культивирования *in vivo*

Субстрат	Количество прижившихся регенерантов, %	Высота надземной части, см	Количество развернувшихся листьев / регенерант, шт.	Размер листьев, см	
				длина	ширина
перлит	50	18±1,41	4,5±0,71	17,00±2,48	3,60±0,31
перлит: стерильный почвенный субстрат 1:1	75	25±5,70	5,5±0,71	23,44±1,93	4,74±0,27
перлит: верховой торф 1:1	60	26±5,70	5,0±1,41	23,50±2,38	4,87±0,17

При использовании в качестве субстрата смеси перлита и стерильного почвенного субстрата приживаемость высаженных регенерантов сорта Суевия была высокая и составила 75%. Используемый состав смеси в виде верхового торфа и перлита снижал частоту адаптации до 50%. Наряду с этим, надземная часть была выше при использовании перлита и стерильного почвенного субстрата (25 см), а также перлита и верхового торфа (26 см).

Количество прижившихся регенерантов сорта Суевия, высаженных в перлит достигало 60% (Тевфик, 2012; Тевфик, Митрофанова, 2013а). Применение перлита снижало количество развившихся листьев на 6 месяц культивирования *in vivo* до 4,5 шт./эксплант (рис. 5.5). Развернувшиеся листья были меньшего размера (длина 17 см, ширина 3,6 см) по сравнению с использованием в качестве субстрата смеси перлита с верховым торфом и стерильного почвенного субстрата.



Рис. 5.5. Регенеранты канны садовой сорта Суевия:

А) до высадки в субстрат; Б) через 1-6 месяцев культивирования *in vivo* (масштаб 1 см); В) на 9 месяц культивирования *in vivo*; Г) через 12 месяцев адаптации *in vivo* (масштаб 10 см)

На 9 и 12 месяц адаптации растений *in vivo* формировали от 2 до 4 адвентивных регенерантов. Их количество увеличивалось, процесс формирования был постоянным и не зависел от периода вегетации *in situ*, так как культивирование растений осуществлялось в контролируемых условиях.

В ходе экспериментов было выявлено, что частота адаптации *in vivo* проростков Дар Востока (от свободного опыления) составляла 45,5-54,5% и зависила от применяемого субстрата (рис. 5.6).

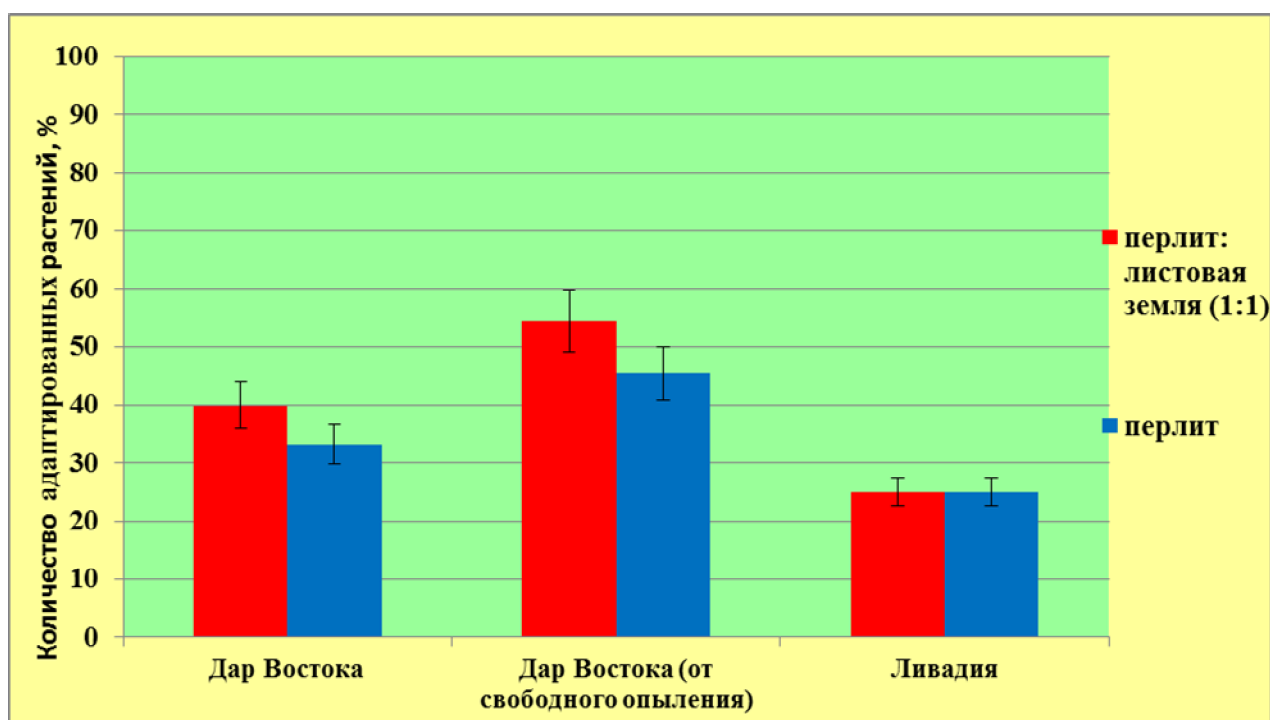


Рис. 5.6. Влияние состава субстрата на количество адаптированных растений канны

Используемый состав смеси в виде перлита и стерильного почвенного субстрата (40%) способствовал получению большего количества прижившихся в условиях *in vivo* растений-регенерантов сорта Дар Востока по сравнению с перлитом (33,3%). Наряду с этим, частота адаптации *in vivo* растений сорта Ливадия составила 25%.

Как показали наши исследования, на 10-15-е сут в условиях *in vivo* отмечали потемнение краев листьев, что приводило в дальнейшем к отмиранию всего листа. Возможно, смена условий культивирования вызывала у регенерантов стресс. Наряду с этим, было выявлено, что адаптация может быть успешной при поддержании 100% влажности воздуха на начальном этапе культивирования (2-3 недели) *in vivo*. При дальнейшем культивировании необходимо постепенное снижение влажности до 50-60%.

Подводя итоги проведенных исследований по укоренению микропобегов канны садовой необходимо отметить, что наибольшей активностью к ризогенезу обладали экспланты сортов Дар Востока и Суевия. Установлено, что у трех изучаемых сортов есть возможность получить регенеранты, пригодные к

высадке на адаптацию *in vivo* на питательных средах, используемых для введения вегетативных почек, формирования меристематических и адвентивного побегообразования.

В ходе экспериментов было выявлено, что самая высокая частота адаптации растений-регенерантов была получена при высаживании их в субстрат, состоящий из перлита, стерильного почвенного субстрата (1:1) и при поддержании 100% влажности воздуха (первые 2-3 недели). У сорта канны Суевия было получено наибольшее количество адаптированных растений (до 75%).

РАЗДЕЛ 6

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА, ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ
ОСОБЕННОСТИ ВОДНОГО РЕЖИМА И ФОТОСИНТЕТИЧЕСКАЯ
АКТИВНОСТЬ *CANNA×HYBRIDA HORT. EX BACKER* ПРИ
КУЛЬТИВИРОВАНИИ *IN VITRO* И *IN VIVO***

Как известно, приспособление к новым условиям культивирования, а именно: перенос растительного материала из условий асептической культуры (*in vitro*) в условия оранжереи (*in vivo*) имеет комплексный характер и основывается на пластичности цито-анатомических структур, лабильности и толерантности биохимических и физиологических параметров, пределы которых определены генетической природой конкретных генотипов (Кутас, 2012).

6.1. Результаты исследования морфологических и структурных характеристик некоторых сортов *Canna×hybrida hort. ex Backer*

Особенности регенерантов канны садовой *in vitro*. При культивировании в условиях *in vitro* растения канны садовой всех изученных сортов достигали высоты 86-160 мм, имели сформированные корни 12-54 мм, большое количество линейных или линейно-ланцетных листьев (рис. 6.1).

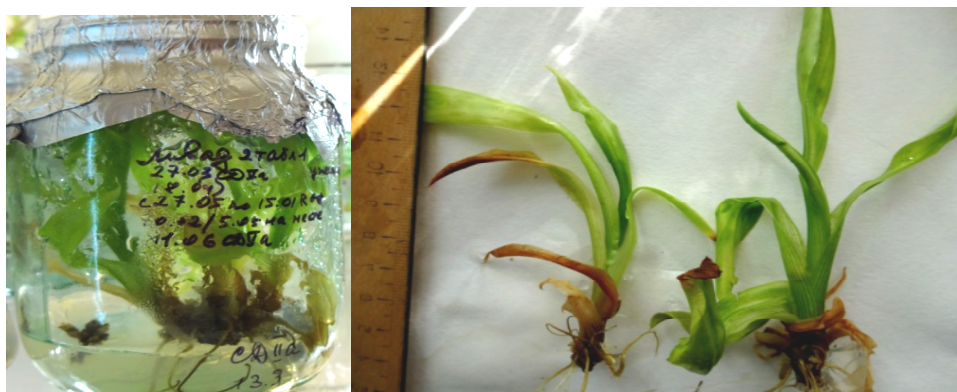


Рис. 6.1. Канна садовая сорта Ливадия *in vitro*

Наиболее крупные листья отмечены у микрорастений сорта Суевия (113×15 мм). Индекс формы у всех сортов низкий от 0,14 до 0,16, что указывает на высокую способность данных растений к использованию света. Нами отмечено, что листья имели типичную зеленую окраску, нижние листья (в основном нижняя пара) были полностью или частично некротизированы.

При проведении исследования анатомического строения листовых пластин выявлено, что для листьев указанных сортов Ливадия и Суевия на этапе культивирования *in vitro* характерна гидроморфная структура: тонкие покровные ткани (10-17 мк), развитая аэренхима и воздухоносные каналы, узкий мезофилл (85,89±7,03 мк и 110,80±4,35 мк соответственно для 'Суевия' и 'Ливадия'). Устьичный аппарат парацитного типа. Листовые пластинки бифациальные, амфистоматические, дифференциация мезофилла на палисадную и губчатую ткань не была выражена (рис. 6.2; табл. 6.1).

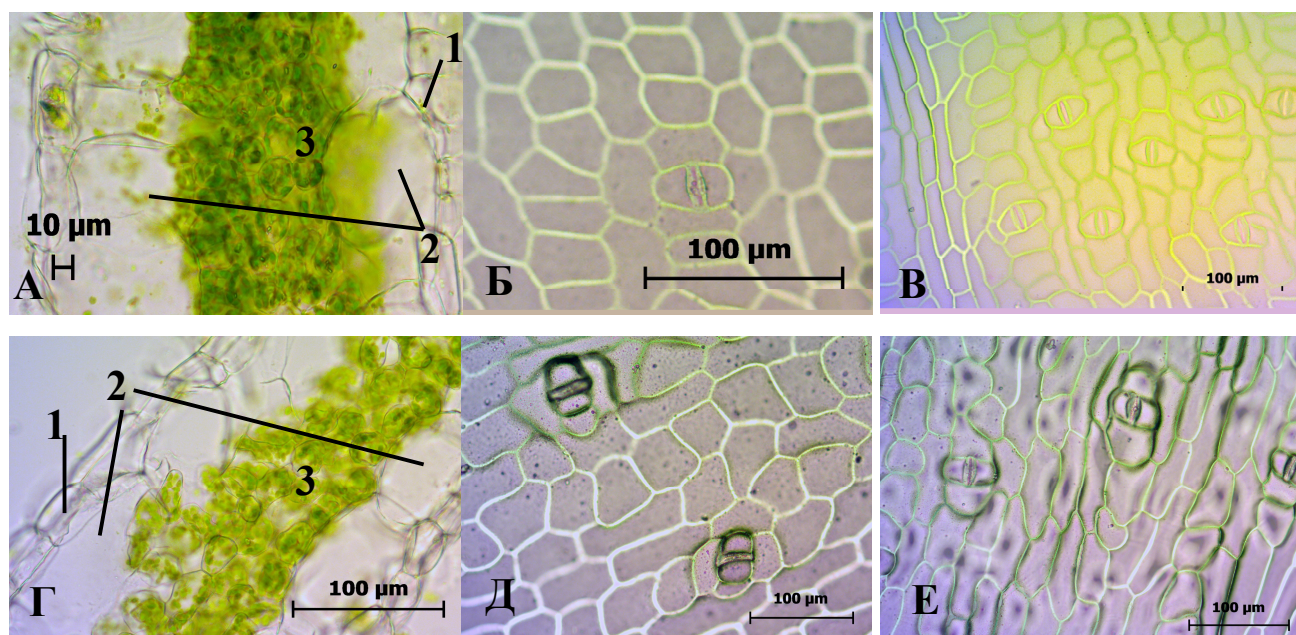


Рис. 6.2. Структура листа канны садовой сортов Суевия (А, Б, В)

и Ливадия (Г, Д, Е) в условиях асептической культуры:

А, Г – поперечные срезы, 1 – эпидерма, 2 – аэренхима, 3 – мезофилл;

Б, Д – слепки адаксиальной эпидермы; В – слепки абаксиальной эпидермы

**Морфологические и анатомические показатели регенерантов канны
садовой во время культивирования *in vitro***

Морфологические характеристики					
Сорт	Высота регенерантов, мм	Количество листьев на регенеранте, шт (M±m)	Длина листа, мм (M±m)	Ширина листа, мм (M±m)	Индекс формы листа
Ливадия	86-114	8 ± 4	82,1 ± 10,9	12,8 ± 4,6	0,16
Суевия	91-160	6 ± 4	112,5 ± 30,1	15,3 ± 4,4	0,14
Анатомические характеристики					
Показатели анатомической структуры листовой пластинки в поперечном разрезе, мк (M±m)				Сорт Суевия	Сорт Ливадия
Толщина листовой пластины				171,15±8,37	199,08±3,98
Толщина адаксиальной эпидермы				11,03±1,40	10,21±1,14
Толщина адаксиальной аэренхимы				30,84±2,30	33,47±1,29
Толщина мезофилла				85,89±7,03	110,80±4,35
Толщина абаксиальной аэренхимы				37,95±5,33	30,22±2,31
Толщина абаксиальной эпидермы				9,84±1,01	9,34±1,18
Характеристика покровных тканей					
Адаксиальная эпидерма	Размер клеток эпидермы (длина х ширина, мк)			42,52 × 25,67	47,75 × 33,64
	Длина устьичной щели, мкм (M±m)			29,70 ± 3,34	31,23 ± 1,02
	Количество устьиц на 1 мм ² поверхности листа, шт. (M±m)			14 ± 1	48 ±5
	Устьичный индекс			6	12
Абаксиальная эпидерма	Размер клеток эпидермы (длина х ширина, мк)			82,45 × 17,02	49,50 × 20,02
	Длина устьичной щели, мкм (M±m)			25,81 ± 0,78	33,01 ± 2,26
	Количество устьиц на 1 мм ² поверхности листа, шт. (M±m)			76 ± 2	29 ± 3
	Устьичный индекс			12	8

Нами выявлено, что гомогенный мезофилл состоит из паренхимных хлорофиллоносных клеток изодиаметрической формы, расположенных в 3-4 слоя, толщина данной ткани 86,07–111,54 мк. Устьица обычно бывают в открытом состоянии. Устьица у канны ‘Суевия’ мельче, чем у сорта Ливадия. Установлены достоверные различия в их распределении. Так, у сорта Суевия

устычных аппаратов больше на абаксиальной стороне. У сорта Ливадия – наоборот: на верхней стороне листа больше устьиц, чем на нижней. Клетки покровных тканей листа однородные, адаксальной эпидермы округло-продолговатые (длина превышает ширину в 1,4–2 раза), абаксиальной – удлинено-продолговатые (длина превышает ширину в 2–4 раза). Более крупные клетки отмечены у сорта Суевия (Tevfik et al., 2015).

Анализ структурных изменений канны в условиях *in vivo*.

Регенеранты были пересажены в почвенную смесь, выращивали в контролируемых условиях оранжереи на протяжении 110 суток. Общая высота растений составила 104–213 мм. Количество листьев от 3 до 10 шт. Большее количество было отмечено у растений сорта Суевия. По форме листа также наблюдали различия: ланцетная форма (172×19 мм) у сорта Суевия и удлинено-яйцевидная (103×18 мм) у сорта Ливадия, индекс формы составил соответственно 0,11 и 0,17. По сравнению с условиями *in vitro* листовые пластинки толще (206 и 235 мк для сортов Ливадия и Суевия соответственно) и мезофилл уже дифференцирован (рис. 6.3).

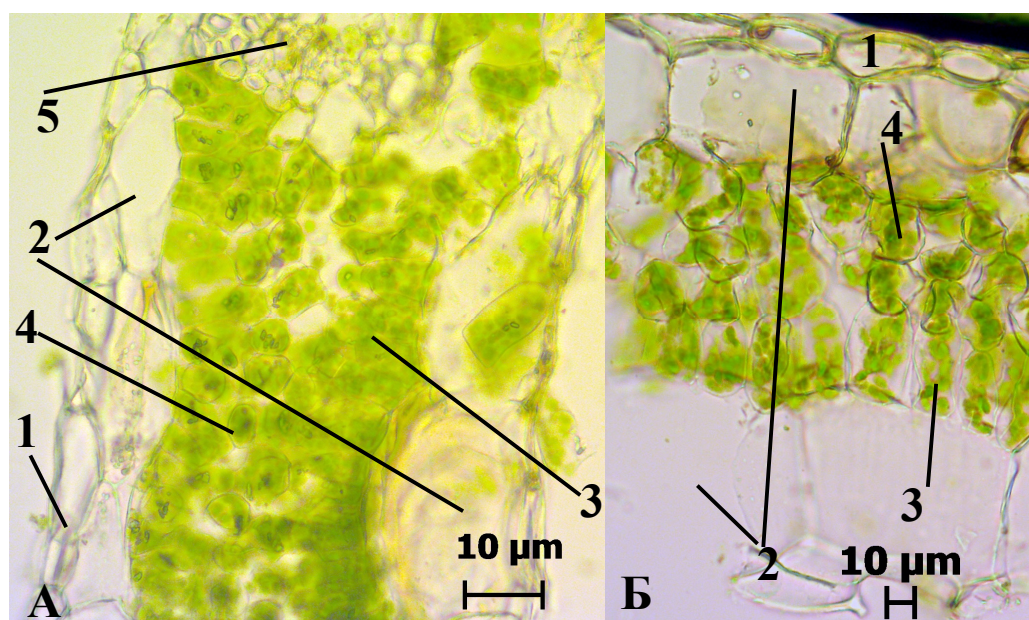


Рис. 6.3. Поперечные срезы листовых пластинок канны садовой сортов Ливадия (А) и Суевия (Б), культивируемых *in vivo*: 1 – эпидерма, 2 – аэренхима, 3 – палисадный мезофилл, 4 – губчатый мезофилл, 5 – проводящий пучок

Палисадная хлоренхима состоит из 1-2 слоев клеток, губчатая ткань представлена 2-3 рядами, коэффициент палисадности не высокий (0,11 и 0,13) (табл. 6.2). Для листьев канны в условиях *in vitro* характерно утолщение клеточных стенок эпидермы, благодаря чему толщина этой ткани составила 13-17 мк. На поперечных срезах видно, что адаксиальная аэренхима больше по сравнению с абаксиальной.

Таблица 6.2

**Количественные показатели анатомической структуры листьев
Canna×hybrida hort. в условиях адаптации (*in vivo*)**

Показатели анатомической структуры листовой пластинки в поперечном разрезе, мк (M±m)		Сорт Суевия	Сорт Ливадия
Толщина листовой пластины		235,10±13,31	205,70±17,28
Толщина адаксиальной эпидермы		17,07±1,17	11,81±2,25
Толщина адаксиальной аэренхимы		59,60±4,59	44,32±3,31
Толщина палисадного мезофилла		26,10±4,84	25,74±12,69
Толщина губчатого мезофилла		80,72±5,52	74,35±12,69
Толщина абаксиальной аэренхимы		30,77±2,98	30,40±3,71
Толщина абаксиальной эпидермы		11,63±1,66	13,70±1,35
Коэффициент палисадности		0,11	0,13
Характеристика покровных тканей			
Адаксиальная эпидерма	Размер клеток эпидермы (длина x ширина, мк)	45,35 × 24,05	51,60 × 37,86
	Длина устьичной щели, мк (M±m)	27,84 ± 1,02	38,14 ± 2,43
	Количество устьиц на 1 мм ² поверхности листа, шт. (M±m)	8 ± 1	7 ± 1
	Устьичный индекс	9	6
Абаксиальная эпидерма	Размер клеток эпидермы (длина x ширина, мк)	52,58 × 29,49	84,20 × 28,24
	Длина устьичной щели, мк (M±m)	31,52 ± 1,57	29,14 ± 0,60
	Количество устьиц на 1 мм ² поверхности листа, шт. (M±m)	39 ± 2	26 ± 3
	Устьичный индекс	4	8

Клетки эпидермы листьев канны становятся мельче, особенно на абаксиальной стороне, количество устьиц на этой стороне в 4-6 раз выше, чем на адаксиальной. Такие структурные изменения способствуют снижению

транспирации, поддержанию тургисцентного состояния листьев и нормализации водного режима в целом. Устьичный индекс у сорта Суевия – 9 и 4, а для ‘Ливадии’ – 6 и 8 (у адаксиальной и абаксиальной эпидермы соответственно), что позволяет судить о том, что структурные изменения покровных тканей в сторону адаптации к водному стрессу выше у сорта Ливадия.

6.2. Анализ параметров водного режима и фотосинтетической активности канн садовой

Изучение меристематидов *Canna × hybrida hort.* в условиях *in vitro* показало, что они были в значительной степени обводненными: 90,1-96,4% от сырого их веса составляла вода, из которой 66,5-83,2% составляла фракция свободной. Меристематиды сорта Суевия содержали в 2 раза больше связанной воды, чем сорта Ливадия. Цвет данных структур коричнево-белый, видны глобулярные структуры зеленого цвета. При анализе индукции флуоресценции выявлено, что для тканей меристематидов характерна низкая фотосинтетическая активность $(F_m - F_{st})/F_m = 0,29-0,35$ отн.ед. Кривая Каутского медленно возрастает (быстрая фаза затягивается до 2,5 сек), переменная флуоресценция 560-700 отн.ед., стационарное состояние наступает также медленнее, чем у листьев регенерантов *in vitro*. Однако так как фотосинтетические процессы в меристематоиде зарегистрированы, можно сделать обоснованное предположение, что на данном этапе культивирования происходят процессы формирования вегетативных органов. Активность фотосинтеза выше у меристематидов сорта Суевия.

Общее содержание воды в тканях листьев канн садовой *in vitro* также очень высокое, обводненность составила 97,7–98,3%, при этом на долю «связанной» фракции пришлось лишь 10,4–39,8% (максимальный у регенерантов сорта Ливадия). Исследования фракционного состава воды регенерантов *in vivo* показывают увеличение связанной воды к уровню 33,0% и 46,7%, при обводненности листьев 90,6–92,7%.

С целью определения характера зависимости изменения морфометрических и структурных показателей листьев с фракционным составом воды в условиях культивирования *in vitro* и адаптации *in vivo* был проведен корреляционный анализ, который установил наличие тесной обратной корреляции между количеством устьиц на адаксиальной и абаксиальной эпидерме с долей связанной воды ($r = -0,91$ и $-0,96$). Также установлена положительная корреляция между толщиной листа и фракцией упорядоченной воды ($r = 0,80$), положительная корреляция характерна для толщины мезофилла и содержанием связанной воды ($r = 0,73$) (Tevfik et al., 2015).

При сравнении параметров фотосинтетической активности на разных этапах культивирования были получены следующие результаты. Базовый уровень флуоресценции (F_0) составлял 896-1456 отн.ед., и наиболее высокий показатель был в вариантах *in vitro*. Наряду с этим выявлены следующие различия в кинетике индукции флуоресценции. У сорта Суевия время достижения F_m составило 47-53 сек (значение $F_m = 3464$ отн.ед. у объектов *in vitro*, 3008 – у *in vivo*), спад кривой носил монотонный характер. У образцов сорта Ливадия состояние максимума флуоресценции (2864-3136 отн.ед.) достигалось за 27-32 сек, наступление стационарного состояния происходило через промежуточное плато (точки S и T). Установлено, что рост флуоресцентного сигнала от F_0 к F_m был наиболее высоким у вариантов сорта Суевия *in vitro* – 2200 отн.ед. и сорта Ливадия *in vivo* – 2048 отн.ед. Рассчитанный показатель ФА (отражает эффективность утилизации света при фотосинтезе) плавно возрастал у сорта Суевия при переносе регенерантов из условий *in vitro* в *in vivo* от 0,52 до 0,63, у сорта Ливадия показатель ФА также достигал более высокого значения – 0,69 в условиях *in vivo*. Минимальный индекс жизнеспособности отмечен у регенерантов сорта Ливадия *in vitro* (1,57), а самый высокий – у того же сорта в варианте адаптации *in vivo* (3,19). Во всех вариантах у сорта Суевия данный индекс варьировал в пределах 2 ед. (2,01 – *in vitro*, 2,67 – *in vivo*).

Следует сказать, что различия в структуре листа сопряжены с их функциональными различиями. Проведенные нами исследования согласуются с

данными М.А. Smith с соавторами, которые пришли к выводу, что для тканей листа в условиях *in vitro* характерна низкая интенсивность фотосинтеза, а после переноса в *in vivo* с развитием хлоренхимы фотосинтетическая активность увеличивается (Smith et al., 1986).

Анализируя полученные данные, можно сделать вывод о более высокой адаптационной способности регенерантов *Canna*×*hybrida* сорта Ливадия в условиях *ex vitro* благодаря нормальному функционированию фотосинтетического аппарата листьев и быстрому восстановлению метаболизма (Браилко и др., 2015; Tevfik et al., 2015).

Таким образом, проведенные морфологические и физиологические исследования регенерантов некоторых сортов канны садовой, являясь составной частью биотехнологических исследований, позволили выделить информативные структурные индикаторы адаптивности и устойчивости к воздействию стрессовых факторов при культивировании *in vitro* и адаптации *in vivo*. К ним можно отнести толщину листовой пластины, степень дифференциации мезофилла, толщину покровных тканей и распределение устьиц. У регенерантов канны садовой дифференциация хлоренхимы на палисадную и губчатую ткань происходит на этапе адаптации *in vivo*, листья амфистоматические с развитой аэренхимой. На данном этапе культивирования у укорененных растений изученных сортов утолщаются покровные и формируются механические ткани, клетки палисадного мезофилла располагаются более плотными слоями, их количество увеличивается. Клетки эпидермы приобретают вытянутые очертания, количество устьиц увеличивается на адаксиальной стороне, размеры их становятся меньше. Учитывая структурные изменения в тканях регенерантов в асептических и контролируемых условиях адаптации *in vivo*, из представленного ассортимента можно выделить сорт Ливадия как растение, имеющее большой потенциал к реализации пластичности к условиям *in vivo*.

РАЗДЕЛ 7

ОСОБЕННОСТИ ДЕПОНИРОВАНИЯ КАННЫ САДОВОЙ

При хранении коллекций *in vitro* в стандартных условиях роста растений (температуре +24°C), существует необходимость частого субкультивирования эксплантов на свежеприготовленную питательную среду, что вместе с увеличением частоты контаминации, может вызвать активное деление клеток и способствовать возникновению соматической изменчивости. Для увеличения интервала между пассажами используют различные методы и приемы, основанные на замедлении роста пробирочных растений (Сидорович и др., 1997; Ширнина, Ширнин, 2012; Brown, Thorpe, 1995; Tanprasert, 1996; Dunaeva et al., 2002; Kovalchuk, 2002; Nazario, 2003; Cruzz-Cruzz, 2013).

Преимущества медленнорастущей коллекции *in vitro*:

- возможность значительно сократить занимаемую площадь;
- асептическое сохранение безвирусного материала;
- облегчение дальнейшего размножения безвирусного материала;
- значительное сокращение затрат (Митрофанова, 2006; Новикова и др., 2008; Withers, Engels, 1990; Malaurie, 2001).

В наших исследованиях увеличение продолжительности беспересадочного хранения различных эксплантов канны достигали при помощи культивирования в условиях пониженной положительной температуры +5°C и интенсивности освещения 0,1-0,5 клк. В качестве питательной среды нами была использована среда ½ МС с добавлением повышенной концентрации осмотика (60 г/л сахарозы) и ингибитора роста ретарданта – ССС в концентрации 0,15-0,4 г/л. Данные концентрации ССС являются оптимальными для целого ряда культур (Митрофанова и др., 2010). Контролем служила питательная среда, на которой эксплант культивировали до закладки на депонирование.

На длительное хранение закладывали следующие типы эксплантов: адвентивные побеги и меристемоиды, образовавшиеся в основании микропобегов сорта Дар Востока, Ливадия и Суевия в стандартных условиях *in vitro*. После переноса эксплантов на питательную среду для сохранения в генобанке *in vitro* их помещали в холодильные камеры (рис. 7.1, 7.2). Растительный материал оценивали через каждые 30 сут депонирования.



Рис. 7.1. Холодильная камера, используемая для медленнорастущей коллекции *in vitro*



Рис. 7.2. Меристемоды канны на средах с различной концентрацией ССС после 5-месячного депонирования

Результаты, представленные в таблице 7.1, демонстрируют предварительную оценку жизнеспособности эксплантов (бонитировку по 4-х бальной шкале).

Таблица 7.1

Состояние эксплантов канны садовой в зависимости от концентрации ССС в питательной среде ½ МС (бонитировка по внешнему признаку по 4-х бальной шкале, представленной в разделе 2)

Генотип	Тип экспланта	Концентрация ССС, г/л	Продолжительность культивирования, месяц						
			1	2	3	4	5	6	7
Дар Востока	адвентивный побег	0,2	4	3	2	2	1	—*	—
		0,4	4	3	2	2	1	—	—
	меристе-моид	контроль (МС+1,5 мг/л БАП+1,5 мг/л ИУК)	4	4	4	3	2	1	—
		0,15	4	4	4	3	3	2	1
		0,2	4	4	4	3	3	3	3
		0,25	4	4	4	3	3	2	1
		0,3	4	4	3	2	1	—	—
Ливадия	меристе-моид	контроль (МС+1,27 мг/л ТДЗ)	4	4	4	2	1	—	—
		0,15	4	4	4	4	3	—	—
		0,2	4	4	4	4	3	3	3
		0,25	4	4	4	4	3	3	2
		0,3	4	4	4	2	1	—	—
		0,4	3	2	2	2	1		
Суевия	адвентивный побег	0,2	4	4	4	4	4	3	3
		0,4	4	3	2	1	—	—	—
	меристе-моид	контроль (МС б/г)	4	4	4	3	2	1	—
		0,15	4	4	4	4	3	3	3
		0,2	4	4	4	3	3	3	3
		0,25	4	4	4	4	3	2	2
		0,3	4	4	4	3	1	—	—

Примечание: *— отсутствие жизнеспособности

В процессе исследований было показано, что при длительном культивировании всех изучаемых сортов канны ясно прослеживается тенденция снижения жизнеспособности при увеличении срока депонирования, а также снижение жизнеспособности при повышении концентрации ССС в питательной среде. Установлено, что для поддержания жизнеспособности меристематидов в условиях генобанка оптимальной концентрацией ССС в питательной среде является 0,15-0,25 г/л (табл. 7.1). Вместе с тем, при культивировании меристематидов канны на контрольной среде без осмотика и ретарданта в условиях пониженной температуры отмечали снижение жизнеспособности на 4 месяц культивирования у всех изучаемых сортов.

В ходе опытов было выявлено, что адвентивные побеги канны исследуемых сортов при депонировании, имели разные показатели жизнеспособности. Так, экспланты сорта Дар Востока начинали темнеть уже через 2 месяца культивирования на питательной среде с 0,2 и 0,4 г/л ССС. Вместе с тем, при культивировании в условиях замедления развития адвентивные побеги сорта Суевия сохраняли жизнеспособность на питательной среде с 0,2 г/л ССС до 6 месяцев депонирования. Однако, повышение концентрации ретарданта до 0,4 г/л способствовало снижению жизнеспособности уже после 2 месяцев культивирования.

В результате проведения экспериментов было выявлено, что при добавлении веществ, замедляющих развитие эксплантов (повышенной концентрации сахарозы и ССС), через 3 месяца депонирования в основании меристематидов изучаемых сортов канны садовой формировались новые меристематиды (табл. 7.2).

Сравнительное изучение влияния концентрации ССС на развитие эксплантов в условиях депонирования показало, что повышение концентрации ретарданта в питательной среде приводило к снижению частоты образования меристематидов сорта Ливадия. Так, на контрольной среде было сформировано в среднем 1,75 меристематидов на эксплант, при

добавлении 0,2-0,25 г/л ССС этот показатель снизился до 0,75 шт./эксплант. Вместе с тем, при культивировании эксплантов сорта Дар Востока образование дополнительных меристемоидных структур отметили только на среде с 0,25 г/л ССС.

Таблица 7.2

**Влияние концентрации ССС на образование меристемоидов
через 3 месяца депонирования**

Генотип	Показатели	Концентрация ССС, г/л					
		контроль	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4
Ливадия	Среднее количество меристемоидов/эксплант, шт.	1,75±0,29	1,2±0,65	0,75±0,29*	0,75±0,55*	0	0
	Средняя длина меристемоидов, см	1,5±0,74	0,25±0,088	0,93±0,22	0,45±0,10	0	0
Дар Востока	Среднее количество меристемоидов/эксплант, шт.	0	0	0	2,00±0,71	0	0
	Средняя длина меристемоидов, см	0	0	0	0,44±0,02	0	0
Суевия	Среднее количество меристемоидов/эксплант, шт.	1,67±0,82	2,50±0,75	2,00±0,71	2,75±0,99	0	0
	Средняя длина меристемоидов, см	0,38±0,12	0,45±0,04	0,55±0,04	0,6±0,06	0	0

Примечание: * – установлено достоверное различие с уровнем значимости $P < 0,095$

В ходе экспериментов было отмечено, что депонирование меристемоидов сорта Суевия на средах с низкими концентрациями ССС (0,15-0,25 г/л) способствовало активизации образования меристемоидов на эксплант (2-2,75 шт.) по сравнению с контролем (1,75 шт.). Наряду с этим, с повышением

концентрации ССС от 0,15 до 0,25 г/л в среде увеличивалась длина меристемоидов от 0,45 до 0,6 см.

Установлено, что использование питательной среды с 0,3-0,4 г/л ССС ингибировало развитие новых меристемоидов и рост имеющихся эксплантов у всех изучаемых нами сортов канны. Более длительный срок депонирования снижал регенерационную способность меристемоидов канны у всех исследуемых сортов. Возможно необходимо повышать значение температуры при продолжительном сохранении растительных объектов.

Таким образом, результаты наших исследований продемонстрировали возможность депонирования меристемоидов и адвентивных побегов 3 сортов канны садовой: Суевия, Ливадия и Дар Востока на протяжении 7 месяцев в беспересадочной культуре. Проведенные эксперименты выявили способность меристемоидов сохранять жизнеспособность и образовывать новые меристемоиды в условиях пониженной температуры на питательной среде $\frac{1}{2}$ МС с добавлением от 0,15-0,25 г/л ССС и 60 г/л сахарозы. Однако для успешного депонирования адвентивных побегов сорта Суевия необходимо добавление в питательную среду 0,2 г/л ССС.

РАЗДЕЛ 8

АНАЛИЗ И ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате изучения литературных источников и проведения экспериментов были получены данные, позволяющие выявить морфогенетические потенции изолированных органов и тканей сортов канны садовой (*Canna × hybrida hort. ex Backer*). Анализируя приведенные в диссертационной работе научные публикации, следует отметить, что все они представлены зарубежными авторами и включают в себя в основном изучение некоторых культур порядка Zingiberales: банана (Sadik et al., 2007; Al-Amin et al., 2009; Ferdous et al., 2015; Paulos et al., 2015; Qamar et al., 2015; Said et al., 2015), маранты, костуса (Chaturvedia et al., 1984), стрелиции, геликонии (Nathana et al., 1993; Meneses Guzmán et al., 2009), этлингеры (Yunus et al., 2012), гедиhiума (Sakhanokhoa et al., 2008), имбиря (Hawallan, 2000; Rout et al., 2001; Bhattacharya, Sen, 2006; Santos et al., 2010), калатеи (Rozali et al., 2014) и альпинии (Singh et al., 2014). По канне имеются незначительное количество научных работ, однако они касаются в основном изучения поражаемости отдельными вирусными возбудителями болезней и вопросов микроразмножения *Canna indica* L. (Kromer, Kukulczanka, 1985), *Canna × generalis* (Wang et al., 2007) и *Canna edulis* Ker (Hosoki, Sasaki, 1991) с применением метода культуры органов и тканей.

К настоящему времени изучены морфогенетические реакции эксплантов некоторых видов канны на отдельных этапах клонального микроразмножения, однако ряд вопросов, таких как стерилизация растительного материала, зависимость особенностей реализации морфогенеза от типа и срока отбора изолированных эксплантов, гистологическое изучение формообразовательных процессов, морфологическая и физиологическая оценка растений при культивировании *in vitro* и *in vivo*, и адаптация регенерантов остаются мало исследованными. Нами проведено сравнительное изучение морфогенетических потенций высечек листа, зрелых и незрелых семян, сегментов завязи и бутонов, изолированных зародышей и

вегетативных почек канн садовой сортов: Ливадия, Суевия, Дар Востока и Президент и установлено влияние различных факторов культивирования на регенерацию растений.

Одной из сложных задач при введении в культуру *in vitro* растительного материала является подавление эндогенной и экзогенной инфекции. Из литературных источников известно, что для представителей порядка Zingiberales характерно проявление высокой частоты контаминации через 1-3 недели после введения в асептические условия культивирования (Rodrigues, 2005; Nietsche et al., 2006). Нами в процессе проведенных исследований были подобраны оптимальные режимы стерилизации эксплантов канн садовой (вегетативных почек), позволяющие значительно снизить количество инфицированных эксплантов (до 20-33%). Так, для сортов Ливадия и Суевия оптимальным было применение следующей схемы ступенчатой стерилизации: обработка в течение 1 минуты в растворе 70% этанола (C_2H_5OH) и в течение 17 минут в растворе 2% гипохлорита натрия ($NaOCl$). Вместе с тем, у канн сортов Президент и Ливадия меньше всего инфицированных эксплантов было получено при следующей ступенчатой стерилизации: 1 минута в растворе 70% этанола (C_2H_5OH), 25-40 мин в растворе коммерческого препарата Дез ТАБ и 20 мин в 1% растворе Thimerosal (Тевфик, 2012).

В большинстве публикаций, касающихся вопросов клонального микроразмножения представителей порядка Имбирецветных указывается, что в качестве эксплантов для разработки биотехнологической схемы размножения чаще всего используются меристемы побегов и вегетативные почки (Priadi et al., 2000; Chaum et al., 2007; Shirani et al., 2009; Azam et al., 2010; Hossain et al., 2010). Так, о способности к морфогенезу высечек листа и сегментов черешка *Maranta arundinacea* и *M. leuconeura* (Simin, 1996), *Strelitzia reginae* Banks (Oliveira Paiva et al., 2004) сообщалось в научных работах ряда зарубежных ученых. При этом, из высечек листа банана сорта Nanjanagudu Rasabale (AAB) удалось индуцировать регенерацию микропобегов через прямой органогенез (Venkatachalam et al., 2007).

В ходе выполнения экспериментов нами выявлено, что процессы морфогенеза в большей степени зависят от типа экспланта. Так, среди используемых эксплантов

канны садовой способностью к регенерации обладали вегетативные почки и изолированные зародыши. Вместе с тем, культивирование в условиях *in vitro* зрелых и незрелых семян на средах Монье и МС, высечек листа, сегментов бутонов и завязи на среде МС с добавлением регуляторов роста БАП, ТДЗ и ИУК, позволило нам сохранить жизнеспособность эксплантов в течение 30-60 суток. Однако длительное культивирование эксплантов приводило к их потемнению и гибели.

Наряду с этим нами установлено влияние генотипа на морфогенез в условия *in vitro* канны садовой. Так, максимальную регенерационную способность на этапе введения в асептические условия из изученных сортов канны обладали вегетативные почки сорта Суевия. Экспланты данного сорта начинали удлиняться на 10 сутки культивирования на питательной среде МС, дополненной 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃. На 30-38 сутки культивирования наблюдали адвентивное побегообразование у сорта Суевия. Однако на среде, используемой нами для введения в условия *in vitro*, коэффициент размножения был низким и не превышал показателя 1,6 шт./эксплант (Тевфик, Митрофанова, 2012). Для повышения частоты регенерации микропобегов 'Суевия' проводили их субкультивирование на питательную среду, содержащую ТДЗ. В случае с эксплантами сортов канны Ливадия, Дар Востока и Президент отмечали низкую морфогенетическую способность при культивировании на питательной среде МС с 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃. Выявлено, что для повышения регенерационной активности эксплантов необходимо осуществлять их пассаж на среду МС, дополненную ТДЗ или 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК.

Известно, что индукция адвентивного побегообразования в основании микропобегов это основной биотехнологический способ размножения растений представителей порядка Имбирецветных. Однако в литературных источниках существуют лишь единичные сообщения о непрямом соматическом эмбриогенезе банана из меристем (Banerjee et al., 1986; Schoofs et al., 1998), из вегетативных почек (Villalobos, Garcia, 2009), из сегментов мужских незрелых цветков (Morais-Lino et al., 2008), из сегментов листьев имбиря (Kackar et al., 1993), из высечек листа, сегментов ложностебля и вегетативных почек имбиря (Suma et al., 2008). Вместе с тем имеются публикации о регенерации микропобегов через прямой органогенез из сегментов

ложностебля и цветка *Maranta arundinacea* L. и *Maranta leuconeura* (Simin, 1996), непрямой органогенез при культивировании мужских цветков банана сорта Sabri (Sultan et al., 2011).

Наряду с этим нами было установлено, что реализация морфогенетического потенциала эксплантов канны садовой в основном осуществлялась через прямой органогенез. Исследования показали, что процесс морфогенеза канны проходил сначала через образование дополнительных микропобегов, а затем при их отделении и при продолжительном культивировании – через формирование меристемоидов в основании микропобегов или через массовое образование меристемоидных кластеров. Таким образом, значительно повышался коэффициент размножения растений.

В процессе исследований нами был модифицирован состав среды МС за счет подбора концентраций регулятора роста цитокининного типа действия ТДЗ, который обеспечивал высокий коэффициент размножения изучаемых сортов канны. Известно, что ТДЗ индуцирует различные морфологические процессы у трудноразмножаемых растений. Так, после инициации развития вегетативных почек канны сорта Ливадия на питательной среде МС с 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃ их пересаживали на среду МС с 1,91 и 2,55 мг/л ТДЗ. Исследования показали, что длительное культивирование микропобегов данного сорта на среде с высокой концентрацией ТДЗ приводило к появлению множества мелких меристемоидов (0,1-0,3 см) по сравнению с образованными на начальном этапе культивирования. В дальнейшем формировался каллус, имеющий зеленую окраску. Наряду с этим, добавление 1,91 мг/л ТДЗ на 120 сут культивирования способствовало образованию в среднем $11,0 \pm 0,47$ меристемоидов на эксплант. Вместе с тем, через 6 месяцев (при пассаже через каждые 3 недели на аналогичную свежеприготовленную питательную среду) отметили образование 40 меристемоидов на эксплант. Вместе с тем нам удалось выявить некоторые особенности образования меристемоидов *de novo*. Так, с увеличением срока культивирования на среде МС с 1,91 мг/л ТДЗ увеличивалось количество образовавшихся меристемоидов. Кроме того, их перенос на безгормональную среду МС или дополненную 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК

способствовало дальнейшему множественному образованию меристемоидов в течение 30-45 сут культивирования. Это может свидетельствовать о способности ТДЗ накапливаться в тканях эксплантов и оказывать пролонгирующее действие даже при отсутствии данного цитокинина, что было подтверждено ранее на культуре банана, как представителя порядка Имбирецветных (Makara et al., 2003, 2007).

Как показали наши эксперименты, оптимальной концентрацией ТДЗ на этапе собственно мироразмножения канны сортов Дар Востока и Суевия является 1,27 мг/л. Так, на данной питательной среде было отмечено образование меристемоидов на 50 сут культивирования. На 120 сут культивирования в основании микропобегов канны сортов Дар Востока и Суевия формировалось в среднем до 6 меристемоидов на эксплант. Наряду с этим, добавление 1,91 мг/л ТДЗ в среду МС у сорта Дар Востока снижало частоту образования меристемоидов на 150 сут культивирования и их количество составило 12 шт. на эксплант по сравнению с 1,27 мг/л ТДЗ (15 шт./эксплант). Вместе с тем, повышение концентрации ТДЗ при культивировании микропобегов Суевия приводило к активному каллусообразованию.

Гистологические исследования позволили нам зафиксировать и подтвердить образование меристемоидов в основании микропобегов двух сортов канны садовой: Суевия и Ливадия. Анализ литературных источников показал, что в настоящее время подобные гистологические исследования немногочисленны (Круглова, 2008). Так, имеются публикации об изучении процесса формирования и особенностей образования вегетативных почек через непрямой органогенез *Actinidia deliciosa* (Popielarska et al., 2006), *Piper nigrum* L. (Sujatha et al., 2003), *Gloriosa super* (Madhavan, Joseph, 2010), *Bauhinia forficata* (Mello et al., 2000), сахарного тростника (Khan, Khatri, 2006). Вместе с тем, существует ряд сообщений, касающихся гистологического изучения образовавшихся меристемоидов ряда культур: *Anthurium andraeanum* Linden (Bhattacharya et al., 2015), *Abies fraseri* (Pursh) Poir. (Saravitz et al., 1993), *Tacitus bellus* (Spasić et al., 2015), *Passiflora edulis* Sims (Gloria et al., 1999) и *Paulownia tomentosa* Steud. (José et al., 2014).

В ходе экспериментов нами подобраны питательные среды для регенерации микропобегов из меристемоидов канны сортов Суевия, Дар Востока и Ливадия. При

переносе меристемоидов 'Ливадия' на питательные среды МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК или WPM с 0,75 мг/л БАП, 'Суевия' на среду МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК или с 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃ в первые 50 сут культивирования наблюдали дальнейшее формирование новых меристемоидов. Увеличение сроков культивирования на этих средах способствовало появлению регенерирующих микропобегов.

Наряду с этим, установлена зависимость повышения частоты регенерации микропобегов от количества субкультивирований. Так, через 5, 9 и 10 пассажей меристемоидов на предыдущих питательных средах для образования меристемоидов у сорта Ливадия и при последующем культивировании на питательной среде WPM с 0,75 мг/л БАП на 60 сут количество регенерировавших меристемоидов составило 30, 72 и 88% соответственно. Аналогичное увеличение частоты регенерации меристемоидов сортов Ливадия и Суевия от количества субкультивирований было отмечено на других исследуемых питательных средах.

Одним из сложных и ответственных этапов клонального микроразмножения является ризогенез. Как показали наши исследования, микропобеги 'Суевия' были склонны к спонтанному корнеобразованию на питательной среде с 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃, используемой на этапе введения в условия *in vitro*. Так, культивирование в течение 145 сут на этой среде способствовало появлению в среднем 3,3 шт. спонтаннообразующихся корней на эксплант со средней длиной 3,7 см.

Вместе с тем, корнеобразование микропобегов сорта Суевия и Дар Востока происходило на питательной среде МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК, используемой для регенерации микропобегов из меристемоидов и среде Пирика с 0,5 мг/л кинетина и 1,0 мг/л НУК. Кроме того, на этих средах одновременно с ризогенезом происходило вытягивание микропобегов, перенесенных со среды 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃, которую использовали для введения эксплантов. Полноценные регенеранты сортов Суевия и Ливадия, имеющие в среднем 6,25-6,50 корней на эксплант и пригодные к высадке на адаптацию к условиям *in vivo*, образовывались на 60-90 сут культивирования на вышеуказанных средах.

Ряд зарубежных авторов часто упоминают об укоренении микропобегов представителей Zingiberales на питательной среде $\frac{1}{2}$ МС с добавлением разных ауксинов (Eslani, Khoushkhoy, 2003; Bakrudeen, 2009). Однако в результате проведения наших экспериментов было выявлено, что возможно исключить специальный этап укоренения микропобегов, объединив этап собственно микроразмножения с этапом корнеобразования (Тевфик, 2012).

Как показали эксперименты по проращиванию семян *in vivo*, применение приемов стратификации и скарификации позволило получить до 46,2% проросших семян сорта Дар Востока. Однако не при одном из способов предпосевной обработки семян канны сорта Ливадия не удалось индуцировать развитие проростков.

Исследования, направленные на культивирование семян *in vitro* не способствовали их прорастанию, что связано с тем, что у семян канны очень твердая семенная кожура. Поэтому для преодоления этих трудностей использовали метод изолирования зиготических зародышей. Изолированные зародыши культивировали на питательной среде Монье в условиях стратификации (+5°C, в темноте) в течение 60 сут, затем пробирки с эксплантами перемещали в стандартные условия культивирования (Тевфик и др., 2013; Тевфик, Митрофанова, 2014).

Отмечена высокая частота прорастания зародышей у сортов Дар Востока и Ливадия (от свободного опыления), которая составляла 90 и 50% соответственно. Гистологические исследования показали, что при культивировании изолированных зародышей в условиях стратификации на 30-е сут культивирования у них появляется до 3 корней, на 60-е сут культивирования формируется 1 настоящий лист. Вместе с тем, нами было установлено, что в тканях семядоли зародышей сортов Ливадия и Дар Востока образовывалось большое количество крахмальных зерен. Анализ научной литературы показал, что аналогичные исследования, касающиеся гистологических особенностей развития зародышей представителей семейства Zingiberales в условиях *in vitro* ранее не проводились.

Вместе с тем, гистологические исследования изолированных зиготических зародышей сорта Дар Востока позволили выявить, что в тканях семядоли при

культивировании на питательной среде Монье формируются соматические зародыши. Аналогичное появление эмбриоидоподобных структур отмечал К. Promtep при культивировании сегментов семядоли *Strelitzia reginae* на питательной среде МС с добавлением 0,5-2,0 мг/л 2,4-Д (Promtep, 1981). Гистологическое изучение образования соматических эмбриоидов отражено в ряде публикаций. Так, такого рода исследования проведены на *Clematis sp.*, *Caladium hortulanum*, *Ficus lyrata*, *Ziziphus jujuba* (Митрофанова, 2011), *Musa spp.* (Lee et al., 2000; Filippi et al., 2001; Houllou-Kido et al., 2005), *Carica papaya* L. (Fernando et al., 2001), *Oryza sativa* (Vega et al., 2009), *Quercus suber* L. (Puigderrajols et al., 2000), *Rhododendron spp* (Зайцева, 2015), *Crasula multicava*, *Ranunculus sceleratus* (Батыгина, 2002).

В ходе проведения экспериментов было выявлено, что при перенесении изолированных зародышей после стратификации в обычные условия культивирования отмечали их дальнейшее развитие. Так, на 35-е сут культивирования были получены полноценные проростки сортов Дар Востока и Ливадия с 3-5 листьями и 5-10 корнями. При анализе литературных источников было выявлено, что ранее исследования по прорастанию зиготических зародышей канн *in vitro* не проводились. Имеются сообщения по эмбриокультуре растений порядка Zingiberales: *Hedychium forrestii* (Xiong et al., 2005), *Heliconia rostrata* и *H. Bihai* (Souza et al., 2010), *Strelitzia reginae* (Fernandez et al., 2008; North et al., 2012; Oliveira Paiva et al., 2004), *Costus speciosus* (Koen.) Sm. (Roy, Pal, 1991).

Адаптация *in vivo* является одним из сложных этапов клонального микроразмножения, связанный с возникновением трудностей из-за смены условий культивирования. Для повышения приживаемости растений нами были подобраны и использованы различные субстраты: перлит, смесь перлита и верхового торфа (1:1), смесь перлита и стерильного почвенного субстрата (1:1). Установлено, что для регенерантов канн сорта Суевия лучшим субстратом является смесь перлита и стерильного почвенного субстрата. В этом случае получено 75% адаптированных регенерантов. Кроме того, при культивировании *in vivo* для растений характерны хорошо развитая корневая система и надземная часть. Обязательным условием для прохождения успешной адаптации является поддержание высокой относительной

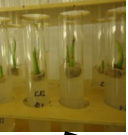
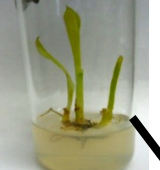
влажности воздуха, так как листья канны садовой обладают высокой транспирационной способностью. Так, после перенесения в условия *in vivo* необходимо в течение 14 сут обеспечить 100% влажность воздуха при помощи изоляторов, а затем постепенно снижать до 50-60% (Тевфик, 2012; Тевфик, Митрофанова, 2013).

Изучение морфологических характеристик, параметров водного режима и фотосинтетической активности хлорофилл-белковых комплексов фотосистем листьев канны садовой среди исследуемых сортов позволили выявить наиболее устойчивый сорт к воздействию стрессовых факторов при культивировании *in vitro* и адаптации *in vivo* – Ливадия. Анализ отечественной и иностранной литературы показал, что изученный нами вопрос о морфологических и физиологических изменениях листовой пластинки канны садовой при адаптации *in vivo* не был ранее освещен в научных публикациях.

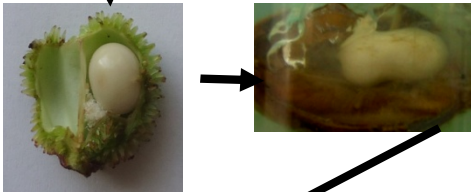
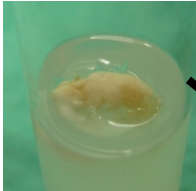
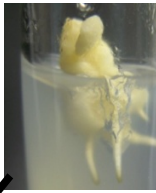
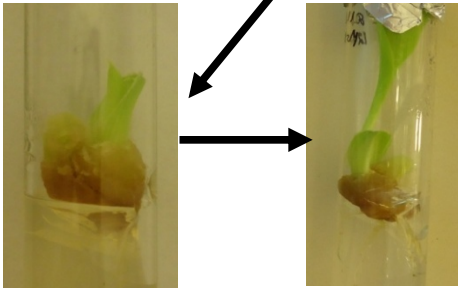
Вместе с тем, была показана возможность депонирования эксплантов канны садовой путем замедления их роста и развития. Анализ литературных источников позволил выявить, что в настоящее время исследования такого плана немногочисленны (Ковальчук и др., 2009; Зелениянская и др., 2009; Молканова, 2009; Молканова и др., 2012; Engelmann, 1997; Orlikowska, 1991; Mitrofanova et al., 2002; Anish et al., 2008). Установлено, что для поддержания жизнеспособности эксплантов канны садовой в условиях медленнорастущей коллекции *in vitro* (+5°C, освещение 0,1-0,5 клк) меристемойиды и вегетативные почки культивируют на питательной среде ½ МС с добавлением 60 мг/л сахарозы и 1,5-2,5 мг/л ССС.

Таким образом, необходимо отметить, что основным результатом выполненных исследований является не только выявление особенностей морфогенеза *in vitro* канны садовой, но и разработка биотехнологической схемы микроразмножения растений 3 сортов канны садовой, состоящей из последовательных этапов (табл. 8.1). Вместе с тем, использование разработанных приемов культивирования изолированных зародышей (табл. 8.2) позволит получить новые формы и таким образом ускорить селекционный процесс канны садовой.

**Биотехнологические этапы клонального микроразмножения растений
канны садовой через культуру вегетативных почек**

Этапы		Условия
1. Отбор эксплантов для введения в условия <i>in vitro</i>		Сроки отбора: август-ноябрь
2. Стерилизация растительного материала		1 мин в 70%-ном растворе этанола; 25-40 мин в 0,3-0,45% растворе коммерческого препарата Дез ТАБ
3. Введение эксплантов в условия <i>in vitro</i>		Состав питательной среды: МС с 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК ₃ . Условия культивирования: 24±1°С, 16-часовой фотопериод и интенсивностью освещения 2-3 клк
4. Регенерация микропобегов		
5. Адвентивное побегообразование		Состав питательной среды: МС с 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК ₃ ('Суевия'); МС с 1,27 мг/л ТДЗ ('Дар Востока', 'Суевия'); МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК ('Дар Востока', 'Суевия')
6. Образование меристемоидов и меристемоидных кластеров		Состав питательной среды: МС с 1,27-1,91 мг/л ТДЗ ('Дар Востока', 'Суевия', 'Ливадия')
7. Регенерация микропобегов из меристемоидов		Состав питательной среды: МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК ('Суевия', 'Ливадия'); WPM с 0,75 мг/л БАП ('Ливадия'); МС с 2-4 мг/л БАП и 0,1 мг/л ГК ₃ ('Суевия')
8. Корнеобразование <i>in vitro</i>		Состав питательной среды: МС с 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК ₃ ; МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК; Пирика с 0,5 мг/л кинетина и 1,0 мг/л НУК
9. Адаптация <i>in vivo</i>		Состав смеси: перлит: стерильный почвенный субстрат – 1:1 Относительная влажность воздуха: 100% (2-3 недели) → 80% (3 недели) → 60% (5 недель)

**Биотехнологические этапы получения селекционных форм
канны садовой**

Этапы		Условия
1. Отбор эксплантов для введения в условия <i>in vitro</i>		Сроки отбора: август-ноябрь
2. Стерилизация растительного материала		Обжиг в пламени спиртовки, вычленение семян, затем зародышей
3. Введение в условия <i>in vitro</i>		Питательная среда: Монье
4. Культивирование в условиях стратификации		В холодильной камере: без освещения при температуре $5 \pm 1^\circ\text{C}$
5. Культивирование в стандартных условиях		В культуральной комнате: $+24 \pm 1^\circ\text{C}$, 16-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 2-3 клк
6. Адаптация <i>in vivo</i>		Состав смеси: перлит: стерильный почвенный субстрат 1:1 Относительная влажность воздуха: 100%

ВЫВОДЫ

1. В результате проведенных исследований процессов развития различных эксплантов 4 сортов канны садовой в условиях *in vitro* установлены особенности и пути морфогенеза *in vitro* (формирование меристемоидов, адвентивных почек и проростков), адаптации их *in vivo*, показаны морфологические и физиологические различия регенерантов *in vitro* и *in vivo*, особенности их депонирования, а также выявлена зависимость этих процессов от трофических, гормональных и физических факторов культивирования, что свидетельствует о высоких потенциальных возможностях роста и развития канны в созданных искусственных системах.

2. Для каждого генотипа определены оптимальные типы эксплантов для введения в культуру *in vitro*: ‘Дар Востока’ (вегетативные почки, изолированные зародыши), ‘Ливадия’ (вегетативные почки, изолированные зародыши), ‘Суевия’ и ‘Президент’ (вегетативные почки).

3. Усовершенствован способ стерилизации вегетативных почек, позволяющий снизить частоту контаминации у сортов Президент и Дар Востока до 20-33,4% при применении раствора Дез ТАБ, у сортов Ливадия и Суевия – до 20-28,6%, используя раствор 3% гипохлорита натрия.

4. Выявлено влияние типа и концентрации регуляторов роста на регенерационный потенциал эксплантов канны садовой. Установлено, что для активного адвентивного побегообразования при культивировании эксплантов сортов Дар Востока и Суевия необходимо добавление в питательную среду 1,27 мг/л ТДЗ, для ‘Ливадии’ – 1,91 мг/л ТДЗ. Длительное культивирование эксплантов канны приводило к индукции процесса прямого органогенеза и массового образования меристемоидов и меристемOIDных кластеров, что позволило значительно повысить коэффициент размножения исследуемых сортов.

5. На основании проведенного гистологического анализа установлено, что у сортов Суевия и Ливадия в условиях *in vitro* морфогенетический потенциал реализуется через этап формирования меристемоидов в основании микропобегов.

6. Выявлены особенности ризогенеза *in vitro*, получены регенеранты 3 сортов канны садовой и показано влияние состава питательной среды на способность микропобегов к корнеобразованию, что дало возможность исключить специальный этап укоренения.

7. Установлено, что для получения полноценных растений в культуре зиготического зародыша сортов Дар Востока и Ливадия (от свободного опыления) необходима их предварительная стратификация в течение 60 сут на среде Монье.

8. Определены оптимальные субстраты и представлены условия, необходимые для адаптации пробирочных растений. Показано, что применение в качестве субстрата смеси перлита и стерильного почвенного субстрата (1:1) позволяет получить 75% успешно адаптированных растений после 6 месяцев культивирования *in vivo* по сравнению с другими изучаемыми сортами.

9. На основе морфологических и физиологических исследований канны садовой, учитывая структурные изменения в тканях меристемоидов и регенерантов в условиях *in vitro* и адаптации *in vivo* установлено, что сорт Ливадия обладает наибольшей адаптационной способностью к изменяющимся условиям культивирования, в частности лабильным водным режимом.

10. Подобраны условия депонирования эксплантов *in vitro* канны садовой (вегетативных почек и меристемоидов), позволяющие замедлять их рост и развитие эксплантов, сохранять на протяжении 7 месяцев на среде $\frac{1}{2}$ МС, дополненной 0,2 г/л ССС, 60 г/л сахарозы, при температуре $+5\pm 1^\circ\text{C}$, освещении 0,1-0,5 клк.

11. На примере сортов Суевия, Ливадия и Дар Востока разработаны и представлены схемы микроразмножения канны садовой для получения регенерантов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для массового размножения посадочного материала сортов канны садовой Дар Востока, Ливадия и Суевия рекомендуется применение разработанной биотехнологической схемы клонального микроразмножения, основанной на культивировании *in vitro* вегетативных почек.

2. Рекомендуется использовать разработанный способ получения проростков из изолированных зародышей для создания новых селекционных форм.

3. Материалы, представленные в диссертационной работе, могут быть включены в учебные курсы и спецкурсы по биотехнологии растений в высших учебных заведениях при подготовке бакалавров и магистров.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аствацатрян, З.А. О сохранении всхожести семян некоторых цветочных растений / З.А. Аствацатрян, Дж. А. Овнанян // Интродукция растений и зеленое строительство. Бюллетень ботанического сада АН Арм. ССР. – Ереван. – № 24. – 1977. – С. 92-98.
2. Байрон, О.В. Инструментальное изучение фотосинтетического аппарата с помощью индукции флуоресценции хлорофилла/ О.В. Байрон, Д.Ю. Корнеев, О.О. Снегур, О.И. Китаев // Методические указания. – Киев. – 2000. – 11с.
3. Батыгина, Т.Б. Размножение растений / Т.Б. Батыгина, В.Е. Васильева. – СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 2002. – 242 с.
4. Биотехнология сельскохозяйственных растений / Пер. с англ. В.И. Негрука. – М.: Агропромиздат, 1987. – 301 с.
5. Браилко, В.А. Изучение параметров флуоресценции хлорофилла а хлоропластов листьев *Canna × hybrida hort.* в условиях *in vitro* и при адаптации *in vivo* / В.А. Браилко, И.В. Митрофанова, О.В. Митрофанова, А.Ш. Тевфик // Материалы VIII Съезда ОФР России и Всероссийской научной конференции «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (21-26 сентября 2015, г. Петрозаводск). – Петрозаводск. – 2015. – С. 80.
6. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений и биотехнологии на их основе: учеб. пособие / Р.Г. Бутенко. – М.: ФРК – Пресс, 1999. – 160 с.
7. Бутенко, Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р.Г. Бутенко. – М.: Наука. – 1964. – 272 с.
8. Бутенко, Р.Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений / Р.Г. Бутенко – М.: Наука, 1975. – 50 с.
9. Вечернина, Н.А. Сохранение биологического разнообразия редких, исчезающих видов, уникальных форм и сортов растений методами

биотехнологии: автореферат дис. доктора биол. наук: 03.00.05, 3.00.12 / Вечернина Нина Александровна. – Новосибирск, 2006. – 32 с.

10. Высоцкая, О.Н. Длительное сохранение *in vitro* коллекции растений земляники / О.Н. Высоцкая // Физ. растений. – 1994. – Т. 41, №6. – С. 935–941.

11. Гамбург, К.З. Ауксины в культуре тканей и клеток растений / К.З. Гамбург, Н.И. Рекославская, С.Г. Швецов – Новосибирск: Наука, 1990. – 242 с.

12. Генкель, П.А. Методические указания по диагностике засухоустойчивости культурных растений / П.А. Генкель. – М. – 1968. – 24 с.

13. Дашкеев, Е.А. Канны в Молдавии / Е.А. Дашкеев. – Кишинев: Штиинца. – 1975. – 65 с.

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

15. Додонова, А.Ш. Активизация синтеза арглабина в суспензионной культуре полыни гладкой / А.Ш. Додонова // Вестник Карагандинского университета, серия биология, медицина, география. – 2010. – №1(57). – С.22-26.

16. Ерушкевич, С.В. Культура канн в Чуйской долине / С.В. Ерушкевич. – Фрунзе: Илим, 1983. – 49 с.

17. Жинкина, Н.А. К методике окраски эмбриологических препаратов / Н.А. Жинкина, О.Н. Воронова // Ботан. журн. – 2000. – Т.85, №6. – С. 168–171.

18. Заид, А. Словарь терминов по биотехнологии для производства продовольствия и ведения сельского хозяйства / А. Заид, Х.Г. Хьюз, Э. Порчедду, Ф. Николас. – Рим: Продовольственная и сельскохозяйственная организация Объединенных Наций. – 2008. – 395 с.

19. Зеленянская, Н.М. Способи збільшення строків зберігання колекції цінних клонів винограду в культурі *in vitro* / Н.М. Зеленянская, Л.В. Джабурия, Н.И. Теслюк // Актуальные проблемы прикладной генетики, селекции и биотехнологии растений: Междунар. научн. конф., посвященная 200-летию

Ч.Дарвина и 200-летию Никитского ботанического сада, 3-6 ноября 2009 г., Ялта: сб. тез. докл. – Ялта, 2009. – С. 121.

20. Зубкова, Н.В. История создания и современного состояния коллекции канны (*Canna × hybrida hort.*) / Интродукция и селекция декоративных растений в Никитском ботаническом саду (современное состояние, перспективы развития и применение в ландшафтной архитектуре): Монография // Под общей редакцией Ю.В. Плугатаря. – Ялта: ГБУ РК "НБС - ННЦ", 2015. – С. 50-56.

21. Иванова, Н.Н. Методические основы клонального микроразмножения некоторых декоративных культур/ Н.Н. Иванова, И.В. Митрофанова, О.В. Митрофанова // Труды Никит. ботан. сада. – 2014. – Т. 138. – С. 57-101.

22. Игнатова, С.А. Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro* / С.А. Игнатова. – Одесса: Астропринт, 2011. – 224 с.

23. Калинин, Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. – Киев: Наукова думка, 1980. – 488 с.

24. Калинин, Ф.Л. Технология микроклонального размножения растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, Г.П. Кушнир. – Киев: Наукова думка, 1992. – 232 с.

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

26. Кефели, В.И. Рассказы о фитогормонах / В.И. Кефели. – М.: Агропромиздат, 1985. – 144 с.

27. Ковальчук, И.Ю. Сохранение и размножение гермоплазмы земляники биотехнологическими методами / И.Ю. Ковальчук, З.Р. Мухитдинова, Н.И. Чуканова, С.Н. Фролов // Актуальные проблемы прикладной генетики, селекции и биотехнологии растений: сб. тез. докл. междунар. научн. конф., посвященной 200-летию Ч.Дарвина и 200-летию Никитского ботанического сада (3-6 ноября 2009 г.). – Ялта, 2009. – С.125.

28. Корзина, Н.В. Индукований морфогенез та клональне мікророзмноження безвірусних сортів черешні *in vitro*: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.20 / Корзина Наталья Васильевна. – Ялта, 2009. – 20 с.
29. Круглова, Н.Н. Каллус как модельная система для изучения формирования модулей растений в условиях *in vitro* / Н.Н. Круглова // Вестник ТвГУ, серия «Биология и экология». – 2008. – Вып. 9. – С. 118-121.
30. Кузьмина, Т.Н. Оценка качества пыльцы *Canna indica* L. и некоторых сортов *Canna* × *generalis* Bailey / Т.Н. Кузьмина // Бюл. Никит. ботан. сада. – 2012. – Вып. 105. – С. 102-106.
31. Кузьмина, Т.Н. Сопряженность генезиса мужской и женской генеративных сфер цветка *Canna indica* L. / Т.Н. Кузьмина // Бюл. Никит. ботан. сада. – 2014. – Вып. 110. – С. 64-69.
32. Кузьмина, Т.Н. Эмбриогенез у *Canna* × *hybrida hort.* (*Cannaceae*) / Т.Н. Кузьмина // Научная дискуссия: вопросы математики, физики, химии, биологии: матер. XXXI междунар. заочной научно-практич. конф., июль 2015, Москва. – №7(26). – Москва, 2015. – С. 59-66.
33. Кунах, В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи / В.А. Кунах. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
34. Кутас, Е.Н. Адаптация регенерантов интродуцированных сортов голубики высокой и брусники обыкновенной, регенерированных в культуре *in vitro*, к условиям *ex vitro* // «Голубиководство в Беларуси: итоги и перспективы»: Материалы Республиканской научно-практической конференции (17 августа 2012 г., Минск, Беларусь). – Минск, 2012. – С.29 – 35.
35. Лакин, Г.Ф. Биометрия: Учеб. пособие для биол. спец. вузов / Г.Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
36. Лищук, А.И. Методика определения водоудерживающей способности к обезвоживанию листьев плодовых культур // Физиологические и биофизические методы в селекции плодовых культур: методические рекомендации / А.И. Лищук. – М., 1991. – С. 33–36.

37. Лотова, Л.И. Морфология и анатомия высших растений / Л.И. Лотова. – М.: Эдиториал УРСС. – 2001. – 528 с.
38. Лысенко, В.С. Флуоресценция хлорофилла растений как показатель экологического стресса: теоретические основы применение метода / В.С. Лысенко, Т.В. Вардуни, В.Г. Соьер, В.П. Краснов // Фундаментальные исследования. Биологические науки. – 2013. – №4. – С. 112–120.
39. Ляшенко, С.К биологии прорастания семян некоторых сортов канны садовой, интродуцированных в Молдавии / С. Ляшенко, К. Андон // Теоретические и методические вопросы изучения семян интродуцированных растений. – Баку, 1981. – С. 131-132.
40. Митрофанова, И.В. Влияние генотипа материнского растения и условий культивирования на способность вегетативных почек и зародышей *Zizyphus jujube* Mill. к морфогенезу *in vitro* / И.В. Митрофанова // Физиология растений. – 1994а. – Т.41, №6. – С. 826-831.
41. Митрофанова, И.В. Использование биотехнологических методов в создании медленно растущих коллекций ценного растительного генофонда / И.В. Митрофанова // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова / За ред. М.В. Роїка. – Київ: Логос, 2006. – Т. 3. – С. 613-618.
42. Митрофанова, И.В. Культивирование незрелых зародышей зизифуса в условиях *in vitro* / И.В. Митрофанова // Укр. ботан. журн. –1994б. – Т. 51, № 4. – С. 94-99.
43. Митрофанова, И.В. Микроклональное размножение субтропических и тропических плодовых культур (обзор литературы) / И.В. Митрофанова // Тр. Никит. ботан. сада. – 1997. – Т. 119. – С. 63-95.
44. Митрофанова, И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур / И.В. Митрофанова. – К.: Аграрна наука. – 2011. – 344 с.

45. Митрофанова, І.В. Спосіб депонування в умовах *in vitro* плодових і декоративних культур: Методичні рекомендації. / І.В. Митрофанова, Н.М. Иванова, О.В. Митрофанова, В.М. Ежов. – Ялта: НБС-ННЦ, 2010. – 36 с.

46. Митрофанова, И.В. Выявление фитопатогенов в садово-парковых агроценозах и биотехнологические пути оздоровления вегетативно размножаемых декоративных и плодовых культур / И.В. Митрофанова, О.В. Митрофанова, В.Н. Ежов, Н.П. Лесникова-Седошенко, Н.В. Корзина, Н.Н. Иванова // Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры: матер. междунар. конф., посвященная 80-летию Центрального ботанического сада Беларуси, Минск, 19-22 июня 2012: – Минск, 2012. – Ч. 2. – С. 423-427.

47. Митрофанова, И.В. Методичні рекомендації з культури недозрілих зародків, культури зав'язі і семя'бруньок та соматичного ембріогенезу ківі, зизифуса, хурми, фейхоа / И.В. Митрофанова, О.В. Митрофанова, Н.М. Иванова, Н.П. Лесникова-Седошенко. – Ялта: НБС-ННЦ, 2010. – 28 с.

48. Митрофанова, И.В. Методические аспекты в исследовании органогенеза и соматического эмбриогенеза представителей семейств Ronunculaceae, Cannaceae, Moraceae, Rosaceae, Murtaceae, Oleaceae, Actinidiaceae / И.В. Митрофанова, О.В. Митрофанова, Н.В. Корзина, Н.П. Лесникова-Седошенко, Н. Н. Иванова, А.Ш. Тевфик, А.Ю. Заяц, Т.И. Пилипчук // Труды Никит. ботан. сада. – 2014а. – Т. 138. – С. 102-136.

49. Митрофанова, О.В. Изучение вирусов цветочных культур и эффективные методы оздоровления растений *in vitro* / О.В. Митрофанова, И.В. Митрофанова // Вісн. Київ. нац. ун. ім. Т. Шевченко. Серія Біологія. – 2001. – Вып. 35. – С. 47-53.

50. Митрофанова, О.В. Применение биотехнологических методов в оздоровлении растений и размножении безвирусного посадочного материала перспективных цветочно-декоративных культур / О.В. Митрофанова, И.В. Митрофанова, Н.П. Лесникова-Седошенко, Н.Н. Иванова. // Труды Никит. ботан. сада. – 2014б. – Т. 138. – С. 5-56.

51. Митрофанова, О.В. Биотехнологические аспекты освобождения от вирусов и клонального микроразмножения некоторых экономически важных многолетних культур / О.В. Митрофанова, А.П. Михайлов, А.В. Чехов // Труды Никит. ботан. сада. – 1997. – Т. 119. – С. 5-12.

52. Молканова, О.И. Генетические банки растений в ботанических садах России / О.И. Молканова // Труды Никит. ботан. сада. – 2009. – Т. 131. – С. 22-27.

53. Молканова, О.И. Биотехнологические методы в сохранении и воспроизводстве генофонда растений / О.И. Молканова, Л.Н. Коновалова // Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры: сб. тез. докл. междунар. конф., посвященная 80-летию Центрального ботанического сада Беларуси, Минск (19-22 июня 2012). – Минск, 2012. – Ч. 2. – С. 431-433.

54. Молканова, О.И. Генетические банки растений: проблемы формирования, сохранения и использования / О.И. Молканова, О.И. Коротков, Е.М. Ветчинкина, Н.А. Мамаева, О.Г. Васильева // Вестник Удмуртского университета «Биология. Науки о земле». – 2010. – Вып. 3. – С. 33-39.

55. Муромцев, Г.С. Основы химической регуляции роста и продуктивности растений / Г.С. Муромцев, Д.И. Чкаников, О.Н. Кулаева, К.З. Гамбург – М.: Агропромиздат, 1987. – 383 с.

56. Новикова, Т.И. Сохранение редких и полезных растений в коллекции *in vitro* Центрального Сибирского ботанического сада / Т.И. Новикова, А.Ю. Набиева, Т.В. Полубоярова // Вестник ВОГиС. – 2008. – Том 12, № 4. – С. 564-572.

57. Никифоров, Ю.Л. Анализ пыльцы видов и сортов рода *Canna* / Ю.Л. Никифоров, Г.Ф. Феофилова // Бот. журнал. – 1982. – Т. 67, №2. – С. 166-176.

58. Паушева, З.П. Практикум по цитологии растений. / З.П. Паушева — М: Колос, 1970. – 255 с.

59. Плиско, М.А. Семейство Cannaceae / Сравнительная анатомия семян. Том 1 / Под ред. А.Л. Тахтаджяна. — Л.: «Наука», 1985. — С. 227-230

60. Попова, Е.В. Создание криобиологических коллекций для сохранения генетических ресурсов высших растений: стратегия или тактика? / Е.В. Попова,

Н.Н. Kim, K.Y. Paek, D.H. Kim, A.M. Носов // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: материалы X Международной конференции (14-18 октября 2013 г.). – Казань, 2013. – С. 51.

61. Рокицкий, П.Ф. Биологическая статистика / П.Ф. Рокицкий. – Минск: Высшейшая школа, 1967. – 367 с.

62. Рыжкова, Н.С. Стабильность растений земляники садовой (*Fragaria ananassa* Duch.) после длительного хранения *in vitro*: автореф. дисс. ... канд. с/х наук: 06.01.07 / Рыжкова Надежда Сергеевна. – Москва, 2005. – 22 с.

63. Садыхов, А.М. Культура канн в городе Кировобаде АзССР / А.М. Садыхов // Повыш. урожайности и улучш. качества продукции полев. культур в АзССР. – Кировобад, 1985. – С.79-81.

64. Самарина, Л.С. Медленнорастущие коллекции *in vitro* как способ сохранения цитрусовых культур в российских субтропиках / Л.С. Самарина, Т.М. Коломиец // сб. тез. Всероссийский симпозиум «Растение и стресс». – Москва, 2010. – С. 311-312.

65. Саматова, И.С. Динамика морфофизиологических показателей ежевики, малины и земляники при длительном хранении *in vitro*: дис. ... кандидата биол. наук: 03.00.12, 03.00.15/ Саматова Индира Саматовна. – Санкт-Петербург, 2009. – 18 с.

66. Сельскохозяйственная биотехнология: Учеб. / В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, С.В. Дегтярев и др.: под ред. В.С. Шевелухи. – М.: Высш. шк., 1998. – 416 с.

67. Сидорович, Е.А. Длительное хранение регенерантов интродуцированных сортов *Vaccinium corymbosum* L. и *Vaccinium vitis-idaea* L. в культуре *in vitro* / Е.А. Сидорович, Е.Н. Кутас, В.Л. Филипеня // Пути решения проблем и перспективы развития биотехнологии в декоративном садоводстве и плодоводстве: сб. тез. докл. междунар. науч. конф., (25-26 сентября 1997 г.). – Ялта, 1997. – С. 11.

68. Тевфик, А.Ш. Регенерация растений канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) в культуре вегетативных почек *in vitro* / А.Ш. Тевфик // Труды Никит. ботан. сада. – 2012. – Т. – С. 426-435.

69. Тевфик, А.Ш. Влияние сроков введения на жизнеспособность первичных эксплантов и индукцию морфогенеза канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) в условиях *in vitro* / А.Ш. Тевфик, И.В. Митрофанова // Бюл. Никит. ботан. сада. – 2012. – Вып. 105. – С. 143-147.

70. Тевфик, А.Ш. Жизнеспособность первичных эксплантов канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) в зависимости от генотипа и сроков введения в условия *in vitro* / А.Ш. Тевфик, И.В. Митрофанова, Н.В. Зубкова // Дендрология, цветоводство и садово-парковое строительство: матер. конф. международной научн. конф., посвященной 200-летию Никитского ботанического сада, (5-8 июня 2012 г.). – Ялта, 2012а – Т.2. – С.160.

71. Тевфик, А.Ш. Изучение регенерационной способности зародышей и семян канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) в условиях *in vitro* / А.Ш. Тевфик, И.В. Митрофанова // Ученые записки Таврического национального университета им. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2014. – Т. 27 (66), № 2. – С. 157-164.

72. Тевфик, А.Ш. Индуцированный морфогенез *in vitro* из органов и тканей канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) / А.Ш. Тевфик, И.В. Митрофанова // Біотехнологія: звершення та надії: матер. II всеукраїнської науково-практич. конф. студентів, аспірантів та молодих вчених, (16-17 травня 2013 р.). – Київ, 2013а. – С. 49-50.

73. Тевфік, А.Ш. Індукція морфогенезу канни садової (*Canna × hybrida hort.*) за умови *in vitro* / А.Ш. Тевфік, І.В. Митрофанова // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2012. – Вип. 60. – С. 58-63.

74. Тевфик, А.Ш. Пути реализации морфогенетического потенциала различных эксплантов канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) в условиях *in vitro* / А.Ш. Тевфик, И.В. Митрофанова // Цветоводство: традиции и современность: VI Междунар. научн. конф., 15–18 мая 2013 г., Волгоград: матер. конф. – Белгород: НИУ «БелГУ», 2013б. – С. 414-416.

75. Тевфик, А.Ш. Индукция ризогенеза *in vitro* ценных сортов канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) / А.Ш. Тевфик, И.В. Митрофанова, О.В. Митрофанова // Проблемы и перспективы исследований растительного мира: матер. междунар. научно-практич. конф. молодых ученых, (13-16 мая 2014а). – Ялта, 2014. – С. 69.

76. Тевфик, А.Ш. Особенности введения в культуру *in vitro* перспективных сортов канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) / А.Ш. Тевфик, И.В. Митрофанова, О.В. Митрофанова // Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры: Материалы Международной конференции, посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Беларуси, (19-22 июня 2012 г.): матер. конф. – Минск, 2012б. – Ч.2. – С. 467-471.

77. Тевфик, А.Ш. Введение в культуру *in vitro* изолированных зародышей и семян канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) / А.Ш. Тевфик, И.В. Митрофанова, О.В. Митрофанова, Н.П. Лесникова-Седошенко // Клеточная биология и биотехнология растений: тез. докл. Междунар. научно-практич. конф., 13-15 февраля 2013 г., Минск, Беларусь:– Минск: Изд. Центр БГУ, 2013. – С. 198.

78. Тевфик, А.Ш. Особенности клонального микроразмножения канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) / А.Ш. Тевфик, И.В. Митрофанова, Т.Н. Кузьмина // Biotechnologia Acta. – 2014б. – Vol. 7, № 5. – С. 71-76.

79. Тевфик, А.Ш. Современные методы размножения канны садовой / А.Ш. Тевфик, И.В. Митрофанова, О.В. Митрофанова, Н.В. Зубкова // Цветоводство. – 2014в. – №6. – С. 2-5.

80. Тевфик, А.Ш. Влияние регуляторов роста на регенерационную способность канны садовой (*Canna × hybrida hort.*) / А.Ш. Тевфик, И.В. Митрофанова, Т.Н. Кузьмина // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2014г. – № 3(3). – С. 124-127.

81. Технология обеззараживания почвенных субстратов при выращивании безвирусного посадочного материала плодовых и ягодных культур в питомниках и маточных насаждениях / В.Г Трушечкин, О.З. Метлицкий, Ф.Я. Поликарпова и др. – М.: Росагропромиздат, 1988. – 36 с.

82. Шевелуха, В.С. Биотехнология в селекции растений / В.С. Шевелуха // Новые методы биотехнологии: II Российский симпозиум, 18–20 мая 1993 г., Пущино: тезисы докл. — Пущино, 1993. — С. 101.
83. Ширнина, И.В. Изучение особенностей культивирования и депонирования редких видов в генетических банках *in vitro* / И.В. Ширнина, С.Ю. Ширнин / Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры: Междунар. конф., посвященная 80-летию Центрального ботанического сада Беларуси. Минск, 19-22 июня 2012: матер. конф. — Минск, 2012. — Ч.2. — С. 431-433.
84. Шолохова, Т.О., Биологические особенности и селекция канны садовой: Автореф. дис... канд. биол. наук: 03.00.05/ Ялта, 2001. — 19 с.
85. Шолохова, Т.А. Канна-тропіканка / Т.О. Шолохова // Квіти України. — 2006. — №1. — С. 7-9.
86. Уоринг, Ф. Рост растений и дифференцировка / Ф. Уоринг, И. Филипс. — М.: Мир, 1984. — 512 с.
87. Феофилова, Г.Ф. Ассортимент и технология выращивания перспективных сортов канны для южных районов страны / Г.Ф. Феофилова // Труды Никит. ботан. сада. — 1991. — Т.112. — С. 41-50.
88. Феофилова, Г.Ф. Каталог цветочных и декоративных растений открытого грунта коллекции Никитского ботанического сада (Канны) / Г.Ф. Феофилова. — Ялта, 1997. — 34 с.
89. Феофилова, Г.Ф. К вопросу о происхождении и современной классификации сортов садовых канн / Г.Ф. Феофилова // Труды Никит. ботан. сада. — 1972. — Т. 59, Вып. 2. — С. 41-50.
90. Феофилова, Г.Ф. Направления селекции канны садовой / Г.Ф. Феофилова // Бюл. Гос. Никит. ботан. сада. — 1987. — Вып. 63. — С.39-40.
91. Феофилова, Г.Ф. Некоторые биологические особенности канны садовой в условиях Крыма: Автореф. дис... канд. биол. наук: 03.00.05 / Феофилова Галина Федоровна. — Л., 1973. — 22 с.

92. Феофилова, Г.Ф. Каталог цветочных и декоративных растений открытого грунта коллекции Никитского ботанического сада (канны) / Г.Ф. Феофилова, Ю.А. Лукс // под ред. Жиликова О.И. — Ялта. — 1977. — 34с.
93. Чемарин, Н.Г. Всхожесть семян канны при различных способах предпосевной обработки / Н.Г. Чемарин, А.Н. Глазурина // Бюл. Никит. Ботан. сада. — 1970. — Вып. 1(12). — С. 43-46.
94. Черевченко, Т.М. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro* / Т.М. Черевченко, А.Н. Лаврентьева, Р.В. Иванников. — К.: Наукова думка, 2008. — 633 с.
95. Эсмонт, И. Реферат Канна садовая в озеленении. Научные основы озеленения городов и сел Молдавии / И. Эсмонт, С. Ляшенко. — Кишинева, 1982. — 62-63 с.
96. Abeyaratne, W.M. *In vitro* propagation of *Rathambala* (*Musa* AAA) and the occurrence of phenotypic variations in the pseudostem / W.M. Abeyaratne, M.A. Lathiff // Annals of the Sri Lanka Department of Agriculture. — 2002. — № 4. — P. 191-197.
97. Adaniya, S. *In vitro* induction of tetraploid ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and its pollen fertility and germinability / S. Adaniya, D. Shira // Scientia Horticulturae. — 2001. — Vol. 88, Issue 4. — P. 277-287.
98. Alaron, P.J.C. Propagacion *in vitro* de *Renealmia alpinia* (Rottb), planta con actividad antiofidica / P.J.C Alaron, R.D.M. Marthnes, C.J.C. Quintana, R.S. Jimenez, C.A. Dhaz, I. Jimenez // Vitae. — 2008. — Vol. 15, № 1. — P. 61-69.
99. Al-Amin, M.D., *In vitro* micropropagation of banana (*Musa* Spp.) / M.D. Al-Amin, M.R. Karim, M.R.A.S. Rahman, A.N.M. Mamun // Bangladesh J. Agril. Res. — 2009. — № 34(4) — P. 645-659.
100. Anasori, P. Effects of light and differentiation on gingerol and zingiberene production in callus culture of *Zingiber officinale* Rosc. / P. Anasori, G. Asghari // Research in Pharmaceutical Sciences. — 2008. — Vol. 3(1). — P. 59-63.
101. Anish, N.P. Conservation using *in vitro* progenies of the threatened ginger — *Boesenbergia pulcherrima* (Wall.) Kuntze / N.P. Anish, M. Dan, M. Bejoy // International journal of botany. — 2008. — Vol. 4(1). — P. 93-98.

102. Arannat, S. Tissue culture of some cut flower bulb crops: Research abstracts of King Mongkut's Institute of Technology, Lat Krabang during fiscal year 1992-1994 / King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang. — Bangkok (Thailand), 1994. — 111 p.

103. Arinaitwe, G. Proliferation rate effects of cytokinins on banana (*Musa* spp.) cultivars / G. Arinaitwe, P.R. Rubaihayo, M.J.S. Magambo // *Scientia Horticulturae*. — 2000. — Vol. 86, Issue 1, № 8. — P. 13-21.

104. Arunyanart, S. Tissue culture of red ginger (*Alpinia purpurata*) / S. Arunyanart // *King Mongkut's Agricultural Journal*. — 1994. — Vol. 12(2). — P. 63-72.

105. Ashmore, S.E. Cryopreservation trials in *Carica Papaya* / S.E. Ashmore, M. Azimi, R.A. Drew // *Acta Hort.* — 2001. — Vol. 560. — P. 117-120.

106. Assis, A.M. Aclimatização de bastão Aclimatização de bastão-do dodo do-imperador (imperador (*Etlingera elatior*) em substratos à base de coco substratos à base de coco / A.M. Assis, R.T. Faria, L.K. Unemoto, L.A. Colombo // *Acta Scientiarum. Agronomy. Maringá*. — 2009. — Vol. 31, №1. — P. 43-47.

107. Azam, F.M.S Clonal propagation of banana (*Musa* Spp.) cultivar “Bari-1” (AAA) genome, sapientum subgroup / F.M.S. Azam, S. Islam, M. Rahmatullah, A. Zaman // *Acta Hort. (ISHS)*. — 2010. — № 879. — P. 537-544.

108. Badoni, A. Micropropagation of *Hedychium spicatum* Smith using in vitro shoot tip / A. Badoni, C. Bisht, J.S. Chauhan // *Stem Cell*. — 2010. — № 1(1). — C. 11-13.

109. Balachandran, S.M. *In vitro* clonal multiplication of turmeric (*Curcuma* spp.) and ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) / S.M. Balachandran, S.R. Baht, K.P.S. Chandel // *Plant Cell Reports*. — 1990. — №8. — P. 521-524.

110. Bakrudeen, A.A.A. *In vitro* propagation of Monocot (*Costus pictus* D. Don) — An antidiabetic medicinal plant / A.A.A. Bakrudeen, K.R. Arun // *Journal of Agricultural Technology*. — 2009. — Vol.5(2). — P. 361-369.

111. Banerjee, N. Aspects and prospects of somatic embryogenesis in *Musa*, ABB, cv. Bluggoe. // N. Banerjee, J. Schoofs, S. Hollevoet, F. Dumortier, E. De Langhe. — *Acta Hort. (ISHS)*. — 1987. — № 212. — P. 727-730.

112. Barra, A.A.G. Acclimatización de vitroplantas de *Etlingera hemisphaerica* 'Red Tulip' / A.A.G. Barra, M.N.J. Mogollón // Rev. Fav. Agron. (LUZ). — 2007. — 24 Supl. 1. — P. 32-38.

113. Basal, S.K. Ornamental plant and biotechnology / S.K. Basal. — Jaipur: Book Enclave. — 2007. — VIII. — 308 p.

114. Bejov, M. Factors affecting the *in vitro* multiplication of the endemic zingiber *Curcuma haritha* Mandaly and Saby / M. Bejov, M. Dan, N.P. Anish // Asian Journal of Plant Sciences. — 2006. — Vol. 5(5). — P. 847-853.

115. Benelli, C.C.A. Vitrication of shoot tips, nodal segments and embryogenic tissue of Olive (*Olea europaea* L.) for germplasm cryopreservation / C.C.A. Benelli, M. Lambardi, P.T. Lynch // Acta Hort. — 2001. — Vol. 560. — P.137-140.

116. Bhatt, S.R. *In vitro* conservation of Musa germplasm: effects of mannitol and temperature on growth and storage / S.R. Bhatt, K.P.S. Chandel // The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. — 1993. — Vol. 68, № 6. — P. 841-846.

117. Bhattacharya, M. Rapid *in vitro* multiplication of disease-free *Zingiber officinale* Rosc. / M. Bhattacharya, A. Sen // Indian Journal of Plant Physiology. — 2006. — Vol. 11, № 4. — P. 379-384.

118. Borroto-Fernandez, E.G. Determination of viral infections in an austrian collection of *Canna indica* / E.G. Borroto-Fernandez, F. Maghuly, A. Fellner, M.Laimer // J. of Plant diseases and protection. — 2008. — № 115 (3). — P. 102-103.

119. Borthakur, M.A protocol for micropropagation of *Alpinia galanga* / M. Borthakur, J. Hazarika, R.S. Singh // Plant cell, tissue and organ culture. — 1999. — Vol. 55, № 3. — P. 231-233.

120. Braga, M.F. Evaluation of a commercial protocol for *in vitro* multiplication of banana (*Musa sp.*) cv. Caipira (AAA) / M.F. Braga, M.E.L. Sa, P.C. Mustafa // Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal. — 2001. — Vol. 23, № 2. — P. 215-219.

121. Bhattacharya, Ch. Efficient organogenesis from the induced meristemoid of *Anthurium andraeanum* Linden cv. Tinora // Ch. Bhattacharya, A. Dam, J. Karmakar, T.K. Bandyopadhyay // Plant Science Today. — 2015. — Vol. 2(2). — P. 82-86.

122. Brindgen, M.P. Low Pressure and Low Oxygen Storage of *Nicotiana tabacum* and *Chrysanthemum morifolium* Tissue Cultures / M.P. Brindgen, G.L. Staby // Plant Sci. Lett. – 1981. – Vol. 22, №1. – P. 177.
123. Brown, D.C.W. Crop improvement through tissue culture / D.C.W. Brown, T.A. Thorpe // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 1995. – Vol.11. – P. 409-415.
124. Calpin, S.M. Mineral Oil Overlay for Conservation of Plant Tissue Cultures / S.M. Calpin // Am. J. Bot. – 1959. – Vol. 46, №5. – P. 324.
125. Carneiro, M.F., Avaliacao de produtos na descontaminacao de explantes de banana (*Musa* AAB cv. Maca) / M.F. Carneiro, G.D. Silva, P.A. Ximenes, I.F. Carneiro, J.D. Borges // Pesquisa Agropecuaria Tropical. – 2000. – Vol. 30(1) – P. 29-35.
126. Chan, L.K. *In vitro* propagation of Zingiberaceae species with medicinal properties / L.K. Chan, H. Weng // Journal of plant biotechnology. – 2004. – Vol. 6(3). – P. 181-188.
127. Chaturvedia, H.C. Proliferation of shoot tips and clonal multiplication of *Costus speciosus* in long-term culture / H.C. Chaturvedia, P. Misraa, M. Jaina // Plant Science Letters. – 1984. – Vol. 35, Issue 1. – P. 67-71.
128. Cha-um, S. Diseases-free production and minimal-grow preservation of *in vitro* banana (*Musa* Spp.) / S. Cha-um, N.M. Tuan, C. Kirdmanee // Acta Hort. (ISHS). – 2007. – № 760. – P. 233-240.
129. Cha-um, S. The *ex vitro* survival and growth of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) influence by *in vitro* acclimatization under hight relative humidity and CO₂ enrichment conditions / S. Cha-um, C. Kirdmanee, K. Primmakong, C. Kirdmanee // Asian Journal of Plant Sciences. – 2005. – Vol. 4(2). – P. 109-116.
130. Chen, Z. *In vitro* culture and plant regeneration of *Alpinia zerumbet* cv. Variegata / Z. Chen, Y. Liu, D. Huang // Northern horiculture. – 2009. – № 8. – P. 82.
131. Colombo, L.A. Estabelecimento de protocolo para multiplicação *in vitro* de bastão-do-imperador (*Etlingera elatior*) Jack RM Sm. / L.A. Colombo, A.M. Assis, R.T. Faria, S.R. Roberto // Acta Scientiarum. Agronomy, Maringá. – 2010. – Vol.32, №4. – P. 695-700.

132. Corredoira, E. Cryopreservation of zygotic embryo axes and somatic embryos of European chestnut / E. Corredoira, M.C. San-Jose, A. Ballester, A.M. Vieitez // *Cryo Letters*. – 2004. – Vol. 25, №1. – P.33-42.

133. Cruz, A.N.V.W. Ctrminacoo da semente *Canna Worszeviczi*. Dietr (Cannaceae) / A.N.V.W. Cruz, V.R.R. Vidal, A.R. Oliveira Cruz // *Rev. ceres/ Univ. fed. Vicosá*. – 1991. – 31, № 217. – C. 174-177.

134. Cruz-Cruz, C.A. Biotechnology and Conservation of Plant Biodiversity / C.A. Cruz-Cruz, M.T. González-Arno, F. Engelmann // *Resources*. – 2013. – Vol. 2. – P. 73-95.

135. Daquinta, M. *In vitro* propagation of arrowroot (*Maranta arundinacea* L.) / M. Daquinta, K. Brown, J.A.T. Silva, F. Sagarra // *International journal of plant developmental biology*. – 2009. – Vol. 3, №1. – P. 15-17.

136. Doods, J.H. Experiments in Plant Tissue Culture. / J.H. Doods, L.W. Roberts. – Cambridge: Cambridge university press, 1985. – 250 p.

137. Dunaeva, S.E. *In vitro* conservation of plant genetic resources at N.I.Vavilov institute of plant industry (VIR) / S.E. Dunaeva, E.V. Truskinov, O.Y. Antonova, N.P. Romanova, T.A. Gavrilenco // *Biotechnology approaches for exploitation and preservation of plant resources: international symposium devoted to 190-th anniversary of Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center, Yalta, 26-31 may 2002*. – Yalta, 2002. – P. 58.

138. Ebrahim, M.K.H. *In vitro* growth and development of *Maranta leuconeura* (cv. Kerchoviana) as affected by medium gelation and pH value / M.K.H. Ebrahim, I.A. Ibrahim // *Journal Egyptian Journal of Horticulture*. – 2000. – Vol. 27. – № 1. – P. 55-67.

139. Ebrahim, M. K.H. Influence of medium solidification and pH value on *in vitro* propagation of *Maranta leuconeura* cv. Kerchoviana / M.K.H. Ebrahim, I.A. Ibrahim // *Scientia Horticulturae*. – 2000. – Vol. 86, Issue 3. – P. 211-221.

140. Engelmann, F. *In vitro* conservation methods / F. Engelmann // *Biotechnology and plant genetic resources: Conservation and use* / Eds. Ford-Lloyd B.V., Newbury J.H., Carrow J.A. – UK: Wallingford: CABI Publishing, 1997. – P. 119-162.

141. Engelmann, F. Present development and use of *in vitro* culture techniques for the conservation of plant genetic resources / F. Engelmann // Acta Hort. – 1997. – № 447. – P. 471-475.
142. Eslani, F. *In vitro* culture of Herbaceous Peony (*Peonia Lactiflora* Andr.) / F. Eslani, M. Khoushkhoy // Iranian journal of horticultural science and technology. – 2003. – Vol. 4(1-2). – P. 43-50.
143. Farahani, F. An improved system for *in vitro* propogation of banana (*Musa acuminata* L.) cultivars / F. Farahani, H. Aminpoor, M. Sheidai, Z. Noormohammadi, M.H. Mazinani // Asian journal of plant sciences. – 2008. – № 7(1). – P. 116-118.
144. Ferdous, M.H. BAP and IBA pulsing for *in vitro* multiplication of banana cultivars through shoot-tip culture / M. H. Ferdous, A. A. Masum Billah, H. Mehraj, T. Taufique, A. F. M. Jamal Uddin // J. Biosci. Agric. Res. – 2015. – Vol. 03, Issue 02. – P. 87-95.
145. Fernandez, A.M.A. Induccion de proembriones somaticos en ave paraiso (*Strelitzia reginae* Banks) / A.M.A. Fernandez, J.L.P. Escutia, H.A.Z. Mancera // Rev. Fitotec. Mex. – 2008. – Vol. 31 (2). – P. 183–186.
146. Fernando, J.A. B. Anatomy of Somatic Embryogenesis in *Carica papaya* L. / J.A. Fernando, M. Melo, M.K.M. Soares, B. Appezzato-da-Glória // Brazilian Archives of Biology and Technology. – 2001. – Vol. 44, № 3. – P. 247 – 255.
147. Filippi, S.B. Histological changes in banana explants, cv. Nanicao (*Musa* spp., Group AAA), submitted to different auxins for induction of somatic embryogenesis / S.B. Filippi, B. Appezzato-da-Gloria, A.P.M. Rodriguez // Revta brasil. Bot., São Paulo. – 2001. – Vol. 24, №4. – P. 595-602.
148. Gabryszewska, E. The effect of glucose and growth regulators on the organogenesis of *Paeonia lactiflora* Pall. *in vitro* / E. Gabryszewska // Journal of fruit and ornamental plant research. – 2010. – Vol. 18, №2. – P. 309-320.
149. Gao, Ch. Study on Embryo culture of Chinese Herbaceous Peony *in vitro* / Ch. Gao // Northern Horticulture. – 2010. – Vol.16. – P. 59.
150. Gao, Ch. Study on Embryo culture of Peony (*Paeonia suffruticosa*) *in vitro* / Ch. Gao // Journal of Anhui Agricultural Sciences. – 2009. – Vol.19. – P. 19.

151. Garsia, A.S. Efeito de reguladores vegetais na germinação e desenvolvimento da sementes *Strelitzia reginae* / A.S. Garsia, E.G.A. Brahquinho, A.C.T.P. Menuchi, K.C.Erlacher; M.C.S Domingues // Thesis São Paulo, ano III. — 2006. — Vol. 5. — P. 161-176.

152. George, E.F. Plant tissue culture procedure — Background / Plant propagation tissue culture 3-rd ed. // eds. E.F. George, M.A. Hall, G. Jan De Klerk. — 2008. — Springer: Dordrech: Netherlands. — P. 1-28.

153. Giri, D. Effect of plant growth regulators (PGRs) on micropropagation of a vulnerable and high value medicinal plant *Hedychium spicatum* / D. Giri, S. Tamta // African Journal of Biotechnology. — 2011. — Vol. 10(20). — P. 4040-4045.

154. Gloria, B.A. Anatomical studies of in vitro organogenesis induced in leaf-derived explants of passionfruit // B.A. Da Gloria, M.L.C. Vieira, M.C. Dornelas // Pesq. agropec. bras., Brasília. — 1999. — Vol. 34, №11. — P. 2007-2013.

155. Gonzalez-Arno, M.T. Cryopreservation of ovules and somatic embryos of citrus using the encapsulation-dehydration technique / M.T. Gonzalez-Arno, J. Juarez, C. Ortega, L. Navarro, N. Duran-Vila // Cryo Letters. — 2003. — Vol. 24, № 2. — P. 85-94.

156. Gubbuk, H. *In vitro* propagation of some new banana types (*Musa Spp.*) / H. Gubbuk, M. Pekmezci // Turk J. Agric. — 2004. — № 28. — P. 355-361.

157. Gubbuk, H. *In vitro* propagation of banana (*Musa spp.*) using thidiazuron and activated charcoal / H. Gubbuk, M. Pekmezci // Acta Agriculturae Scandinavica. — 2006. — Vol. 56, № 1 — P 65-69.

158. Guzmán, M.J.M. Regeneración *in vitro* de *Heliconia psittacorum*, variedad choconiana, usando el sistema de sección transversal delgada "Tcls" (thin cells layer) / M.J.M. Guzmán, N.R. Martínez, L. Atehortúa // Revista Científica UDO Agrícola, — 2009. — Vol. 9, № 3. — P. 547-555.

159. Häggman, H. Cryopreservation of forest tree germplasm / H. Häggman, L. Ryynänen, T. Aronen // Acta Hort. — 2001. — Vol. 560. — P.121-124.

160. Hamirah, M.N. Micropropagation of red ginger (*Zingiber montanum* Koenig), a medicinal plant / M.N. Hamirah, H.B. Sani, P.C. Boyce, S.L. Sim // AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol. — 2010. — Vol. 18 (1). — P. 127-130.
161. Haq, I. Bio-chemical contents and micro-propagation efficiency in banana / I. Haq, M.U. Dahot // Journal of Biological Sciences. — 2007. — Vol. 7(4). — P. 585-591.
162. Haq, I. Micropropagation efficiency in banana (*Musa* sp.) under different immersion system / I. Haq, M.U. Dahot // Pakistan Journal of Biological Sciences. — 2007. — Vol. 10(5). — P. 726-733.
163. Haq, I. Morpho-physiological aspects of micro-propagating banana under different hormonal conditions / I. Haq, M.U. Dahot // Asian Journal of Plant Sciences. — 2007. — Vol. 6(3). — P. 496-501.
164. Hartati, R. Faktor-Faktor Yang Mempengaruhi Keberhasilan Perbanyakan Tanaman Garut (*Marantas arundinacea* L.) Melalui Kultur Jaringan / R. Hartati, D.E. Rantau, E. Suudarmonowati // Journal Natur. Indonesia III. — 2000. — №1. — P. 19-26.
165. Hawallan, J. *In vitro* triple indexing of edible ginger (*Zingiber officinale*) / J. Hawallan // Pacific agric. — 2000. — Vol. 11. — P. 11-15.
166. Helliot, B. Development of *in vitro* techniques for elimination of virus diseases from *Musa* / B. Helliot, B. Panis, A. Locicero, K. Reyniers, H. Muylle, M. Vandewalle, C. Michel, R. Swennen, P. Lepoivre // Acta Hort. (ISHS). — 2001. — № 560. — P. 535-538.
167. Hirimburegama, K. Cultivar specificity with respect to *in vitro* micropropagation of *Musa spp.* (Banana and Plantain) / K. Hirimburegama, N. Gamage // The Journal of Horticultural Science and Biotechnology. — 1997. — Vol. 72, № 2. — P. 205-212.
168. Hosoki, T. *In vitro* propagation of herbaceous peony (*Paeonia Lactiflora* pall.) by a longitudinal shoot-split method / T. Hosoki, M. Ando, T. Kubara, M. Hamada, M. Itami // Plant Cell Reports. — 1989. — Vol. 8, № 4. — P. 243-246.
169. Hosoki, T. *In vitro* propagation of *Canna edulis* Ker. by longitudinal shoot-split method / T. Hosoki, H. Sasaki // Plant tissue culture letters. — 1991. — № 8(3). — P.175-178.

170. Hossain, A. Establishment of a suitable and reproducible protocol for *in vitro* regeneration of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) / A. Hossain, L.Hassan, A.K. Patwary, M.S. Mia, S.D. Ahmad, A.H. Shan, F. Batool // Pak. J. Bot. — 2010. — Vol. 42(2). — P. 1065-1074.

171. Houllou-Kido, L.M. Somatic embryogenesis and the effect of particle bombardment on banana Maçã regeneration / L.M. Houllou-Kido, E.A. Kido, M.C. Falco, M.C. Silva Filho, A.V. Oliveira Figueira, N. Lima Nogueira, M.L. Rossi, A. Tulmann Neto // Pesq. agropec. bras., Brasília. — 2005. — Vol.40, №.11. — P. 1081-1086.

172. Jagadev, P.N. A fast protocol for *in vitro* propagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) of a tribal district of India / P.N. Jagadev, K.N. Panda, S. Beura // Acta Hort. (ISHS). — 2008. — № 765. — P. 101-108.

173. Jamil, M. Regeneration of ginger plant from callus culture through organogenesis and effect of CO₂ enrichment on the differentiation of regenerated plant / M. Jamil, J.K. Kim, Z. Akram, S.U. Ajamal, E.S. Rha // Biotechnology. — 2007. — № 6(1). — P. 101-104.

174. Jia, W. 'Fengdan' embryo culture and plantlet regeneration of Peony / W. Jia, H. Liu // Northern Horticulture. — 2009. — Vol.3. — P. 26.

175. José, M.C.S. Histology of the regeneration of *Paulownia tomentosa* (Paulowniaceae) by organogenesis / M.C. S. José, M.J. Cernadas, E. Corredoira // Rev. Biol. Trop. — 2014. — Vol. 62 (2). — P. 809-818.

176. Joshi, S.C. Effects of H₂SO₄ on seed germination and viability of *C. indica* a medicinal plant. / S.C. Joshi, S.C. Pant // AJS. — 2010. — Vol. 6(6). — P. 24-26.

177. Idris, F.D. Establishment of embriogenic cell suspension and field evaluation of regenerants of *Zingiber Zerumbet* Smith. / F.D. Idris, M. Jalil, H. Ibrahim, N. Khalid // Acta Hort. — 2009. — Vol. 829. — P. 319-324.

178. Illg, R.D. Micropropagation of *Alpinia purpurata* from inflorescence buds / R.D. Illg, R.T. Faria // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. — 1995. — Vol. 40, №2. — P. 183-185.

179. Inden, H. Micropropagation of ginger / H. Inden, T. Asahira, A. Hirano // Acta Hort. (ISHS). — 1988. — № 230. — P. 177-184.

180. Integration of Conservation Strategies of Plant Genetic Resources in Europe: Proceedings of an International Symposium on Plant Genetic Resources In Europe held in Gatersleben, Edited by F. Begemann und K. Hammer – Germany, Gatersleben, December 6-8, 1993. – Gatersleben, 1993. – 222 p.

181. Kackar, A. Plant regeneration via somatic embryogenesis in ginger / A. Kackar, S.R., Bhat, K.P.S. Chandel, S.K. Malik // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1993. – Vol. 32. – P. 289-292.

182. Kambaska, K.B. Effect of plant growth regulator on micropropagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) cv. Suprava and Suruchi / K.B. Kambaska, S. Santilata // Journal of Agricultural Technology. – 2009. – Vol.5(2) – P. 271-280.

183. Kalimuthu, K. *In vitro* micropropagation of *Musa sapientum* L. (Cavendish Dwarf) / K. Kalimuthu, M. Saravanakumar, R. Senthilkumar // African Journal of Biotechnology. – 2007. – Vol. 6 (9). – P. 1106-1109.

184. Kanchanapoom, K. The influence of explant types and orientation on *in vitro* culture of *Musa balbisiana* ‘Kluai Hin’ (BBB group) / K. Kanchanapoom, N. Promsorn // Notulae Scientia Biologicae. – 2011. – Vol. 3, Issue 3. – P. 89.

185. Karnataka, J. Effect of Antioxidant on *in vitro* establishment of *Strelitzia reginae* through shoot tip explants / J. Karnataka // Agric. Sci. – 2008. – Vol. 21(2). – P. 324-325.

186. Kaviani, B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation / B. Kaviani // Australian Journal of Crop Science. – 2011. – № 5(6). – P.778-800.

187. Kavyashree, R. An efficient *in vitro* protocol for clonal multiplication of Ginger – var. Varada / R. Kavyashree // Indian Journal Biotechnology. – 2009. – Vol. 8. – P. 328-331.

188. Khan, I.A. Plant regeneration via organogenesis or somatic embryogenesis in sugarcane: histological studied / I.A. Khan, A. Khatri // Pak. J. Bot. – 2006. – Vol. 38(3). – P. 631-636.

189. Khatun, A. Large scale multiplication of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) from shoot-tip culture / A. Khatun, S. Nasrin, M.T. Hossain // OnLine Journal of biological sciences. – 2003. – Vol. 3(1) – P. 59-64.

190. Khoshoo, T.N. Genetic-evolutionary studies on cultivated cannas / T.N. Khoshoo, I. Mukherjee // Theoretical and Applied Genetics. – 1970. – Vol. 40, № 5. – P. 204-217.

191. Kochuthressia, K.P. Efficient regeneration of *Alpinia purpurata* (Vieill.) K.Schum. plantlets from rhizome bud explants / K.P. Kochuthressia, S.J. Britto, J.M. Raj, M.O. Jaseentha, S.R. Senthilkumar // International Research Journal of Plant Science. – 2010. – Vol. 1(2). – P. 43-47.

192. Kovalchuk, I. New Techniques for Rapid Cryopreservation of Dormant Vegetative Buds / I. Kovalchuk, T. Turdiev, Z. Mukhitdinova, S. Frolov, B.M. Reed, G. Kairova. // Acta Horticulturae. – 2014. – № 1039. – P. 137-146.

193. Kovalchuk, I. Optimization of *in vitro* growth medium for a wild Kazakhstan Apricot, *Prunus armeniaca* / I. Kovalchuk, Z. Mukhitdinova, T. Turdiyev, G. Madiyeva, B. Reed. // Acta Horticulturae. – 2015. – № 1939. – P. 125-133.

194. Kromer, K. Biological activity of endogenous and influence of exogenous growth regulators on *Canna indica* regeneration *in vitro* / K. Kromer // Acta Hort. (ISHS) – 1979. – № 91. – P. 295-300.

195. Kromer, K. *In vitro* cultures of meristem tips of *Canna indica* / K. Kromer, K. Kukulczanka // Acta Hort. – 1985. – № 167. – P. 279-286.

196. Kyte, L. Plant from test tubes. An Introduction to Micropropagation. – Portland: Oregon: Timber Press, 1987. – 160 p.

197. Lambardi, M.C.A. Cryopreservation of woody species by vitrification of shoot tips and embryogenic tissue / M.C.A. Lambardi, C. Benelli, G. Bartolini // Acta Hort. – 2001. – Vol. 560. – P. 125-128.

198. Lata, H., *In vitro* germplasm conservation of high Δ^9 - tetrahydrocannabinol yield elite clones of *Cannabis sativa* L. under slow growth conditions / H. Lata, S. Chandra, Z. Mehmedic, I.A. Khan, M. ElSohly // Acta Physiologiae Plantarum. – 2012. – Vol. 34, Issue 2. – P. 743-750.

199. Lee, K.S. Histology of somatic embryo initiation and organogenesis from rhizome explants of *Musa* spp. / K.S. Lee, F.J. Zapata-Arias, H. Brunner, R. Afza // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1997. – Vol. 51. – C. 1-8.

200. Lescano, Y. *In vitro* propagation of *Paeonia Sp.* / Y. Lescano, M. Escalona, M. Daquinta // *Actu Biol.* — 2010. — Vol.32, № 92. — P.19-28.
201. Lima, J.D. Controle de bacterias contaminantes em explantes de bananiera (*Musa AAA* cv. Caipira) / J.D. Lima, W.S. Moraes // *Pesquisa Agropecuria Tropical.* — 2006. — Vol. 36 (3). — P. 181-186.
202. Lincy, A. Enhanced adventitious shoot regeneration from aerial stem explants of ginger using TDZ and its histological studies / A. Lincy, B. Sasikumar // *Turk J Bot.* — 2010. — № 34. — P. 21-29.
203. Litz, R.E. Tropical and subtropical fruits and vegetables / R.E. Litz, R.L. Jarret, H.P. Asokan // *Tissue culture as a plant production system for horticultural crops* / Ed R. H. Zimmerman, F.A. Griesbach, F.A. Ammerschlag, R.H. Lawson. — Nijoff: Dodrecht; Netherlands, 1986. — P. 237-251.
204. Lloyd, G. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture / G. Lloyd, B. McCown // *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* — 1980. — Vol. 30. — P. 420-427.
205. Lockhart, B.E.L. Evidence for a double-stranded circular DNA genome in a second group of plant viruses / B.E.L. Lockhart // *Phytopathology.* — 1990. — Vol. 80. — P. 127-131.
206. Lockhart, B.E.L. Occurrence of *Canna yellow mottle virus* in North America / B.E.L. Lockhart // *Acta Hort.* — 1988. — № 234. — P. 69-72.
207. Madhavan, M. Histological marker to differentiate organogenic calli from non organogenic calli of *Gloriosa superba* L. / M. Madhavan, J.P. Joseph // *Plant Tissue Cult. and Biotech.* — 2010. — Vol. 20(1). — P. 1-5.
208. Mahdi, H.J. Metabolic fingerprinting of three Malaysian Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) using gas chromatography-mass spectrometry / H.J. Mahdi, R. Andayani, Ishak // *American Journal of Applied Sciences.* — 2010. — Vol. 7 (1). — P. 17-23.
209. Makara, A.M. Carry-over effect of thidiazuron in banana *in vitro* propagation at different culture cycles and incubation conditions / A.M. Makara, P.R Rubaihayo,

M.J.S. Magambo // African crop science conference proceedings. — 2003. — Vol. 6. — P. 113-118.

210. Makara, A.M. Carry-over effect of thidiazuron on banana *in vitro* proliferation at different culture cycles and light incubation conditions/ A.M. Makara, P.R Rubaihayo, M.J.S. Magambo // African Journal of Biotechnology. — 2010. — Vol. 9 (21). — P. 3079-3085.

211. Malabadi, R.B. Effect of triacontanol on the micropropagation of *Costus speciosus* (Koenig) Sm. using rhizome thin section / R.B. Malabadi, G.S. Mulgund, K. Nataraja // *In vitro* cellular and developmental biology. — 2005. — Vol. 41(2). — P.129-132.

212. Malaurie, B. Medium-and Long-term conservation and safe international exchange of germplasm from food and cash tropical crops / B. Malaurie // Acta Hort. — 2001. — Vol. 560. — P. 69-77.

213. Malaurie, B. Medium-term and long-term *in vitro* conservation and safe international exchange of yam (*Dioscorea* spp.) germplasm / B. Malaurie, M. Trouslot, J. Berthaud, M. Bousalem, J. Dubern // Electronic Journal of Biotechnology. — 1998. — Vol. 1, № 3. — P. 104-117.

214. Marino, M.T. First report of *Canna yellow mottle virus* (CaYMV) in Italy and in the Netherlands / M.T. Marino, E. Ragozzino, B. Lockhart, R. Miglino, D. Alioto // Plant Pathology. — 2008. — Vol. 57, № 2. — P. 394.

215. Mello, M.O. Bauhinia forficata Link shoot regeneration: Histological analysis of organogenesis pathway / M.O. Mello, M. Melo, B. Appezato-da Gloria // Brazilian Arch. Biol. Technol. — 2000. — Vol. 43(4). — P. 6.

216. Meneses Guzmán, A.J. *In vitro* regeneration of *Heliconia psittacorum*, choconiana variety using thin cell layer (tcls) culture system / A.J. Meneses Guzmán, N. Rojas Martínez, L. Atehortúa Garcés // Revista Científica UDO Agrícola. — 2009. — Vol. 9, № 3. — P. 547-555.

217. Minas, G.J. Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) sanitation and micropropagation *in vitro* / G.J. Minas // Acta Hort. (ISHS). — 2010. — № 853. — P. 92-98.

218. Mishra, T. An overview on the *in vitro* regeneration of Canna / T. Mishra, A. K. Goyal, A. Sen // Int. J. Fund. Appl. Sci. — 2015. — Vol. 4, № 10. — P. 1-11.
219. Mitra, G.C. Inorganic salts and differentiation of protocorms in seeds callus of an orchid and correlated changes in its free amino acid content / G.C. Mitra, R.N. Prasad, A.Roychowdhury // Ind. J. Exp. Biol. — 1976. — Vol. 14. — P. 350-351.
220. Mitrofanova, I.V. Gene-pool collection in Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center / I.V. Mitrofanova, O.P. Movchan, V.A. Shishkin, V.I. Mitrofanov // Bull. of the State Nikitsky Bot. Gardens. — 2002. — № 85. — P. 30-33.
221. Mitrofanova, I.V. Using broad genetic diversity and *in vitro* culture to enhance of breeding of some subtropical fruit plants / I.V. Mitrofanova, O. V. Mitrofanova // Acta Hort. — 2000. — №538. — C.169-172.
222. Mohanty, S. Micropropagation of *Zingiber rubens* and assessment of genetic stability through RAPD and ISSR markers / S. Mohanty, M.K. Panda, S. Sahoo, S. Nayak // Biologia Plantarum. — 2011. — Vol. 55, № 1. — P. 16-20.
223. Monger, W.A. The complete genome sequence of *Canna yellow streak virus* / W.A. Monger, I.P. Adams, R.H Glover, B. Barrett // Archives of Virology. — 2010. — Vol. 155, № 9. — P.1515-1518.
224. Monger, W.A. *Canna yellow streak virus*: a new potyvirus associated with severe streaking symptoms in canna / W.A. Monger, V. Harju, A. Skelton B. Barrett // Archives of Virology. — 2007. — Vol. 152, № 8. — P. 1527-1530.
225. Monnier, M. Croissance et developpement des embryons globulaires de *Capsella bursa-pastories* cultives *in vitro* dans du milieu a base d'une nouvelle solution minerale / M. Monnier // Bull. Soc. Bot. France Memories, Coll. Morphologie. — 1973. — P. 179-194.
226. Morais-Lino, L.S. Cell suspension culture and plant regeneration of a Brazilian plantain, cultivar Terra / Morais-Lino L.S., Santos-Serejo dos J.A., J.R.F. Oliveira e Silva de S. Santana, A.K. Kobayashi // Pesq. agropec. bras. — 2008. — Vol. 43, № 10. — P. 1325-1330.

227. Muhammad, A. Clonal propagation of ginger through shoot tip culture / A. Muhammad, A. Quraishi // Pakistan Journal of Biological Sciences. — 1999. — Vol. 2(1). — P. 145-147.
228. Mukunthakumar, S. *In vitro* cloning and homestead cultivation of primitive *Musa* cultivars. / S. Mukunthakumar, S. Seeni // Indian J Exp Biol. — 2005. — № 43(1). — P. 90.
229. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. — 1962. — Vol. 15, №3. — P. 473-497.
230. Nathana, M.J. High frequency plant regeneration in *Heliconia psittacorum* L.f. / M.J. Nathana, P.P. Kumara, C.J. Goh // Plant Science. — 1993. — Vol. 90, Issue 1. — P. 63-71.
231. Navalinskienė, M. Dekoratyvnių augalų virusinės ligos ir jų sukėlėjai leituvoje. Monografija. / M. Navalinskienė, M. Samuitiene. — Kaunas: Letude, 2006. — 256 p.
232. Nazario, C.S. *In vitro* propagation of breadfruit (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg) for germplasm conservation and exchange: A thesis submitted to the graduate division of the university of Hawai'i in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science in horticulture (ecology, evolution and conservation biology). — august 2003. — University of Hawai'i, 2003. — 133 p.
233. Neil, O.A. Breeding. Flower Seed Crops. 5 Chapter / O.A. Neil // Flower Seeds: Biology and Technology / Eds. by M.B McDonald, Y. Francis, F.Y.Kwong. — CABI Publishing: Wallingford, 2005. — P. 53-86.
234. Neves, T.D.S. Developmental of *in vitro* diploid banana plantlets obtained from embryo culture / T.D.S. Neves, S.O. Silva, R.P. Oliveira // Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal. — 2002. — Vol. 24, №1. — P. 6-9.
235. Nietsche, S. Estabelecimento *in vitro* de explantes de tres cultivares de bananeira / S. Nietsche, S.V. Margues, M.C.T. Pireira // Ciencia Rural. — 2006. — Vol.36, №3. — P. 989-991.

236. Nirmal Babu, K. *In vitro* plant regeneration from leaf-derived callus in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) / K. Nirmal Babu, K. Samsudeen, M.J. Ramamba // Plant cell, Tissue and Organ Culture. — 1992. — Vol. 29. — P. 71-74.

237. Nitsch, J.P. Experimental androgenesis in *Nicotiana* / J.P. Nitsch // Phytomorphology. — 1964. — Vol. 19. — P. 389-404.

238. Nkere, C.K. Optimizing concentrations of growth regulators for *in vitro* ginger propagation / C.K. Nkere, E.N.A. Mbanaso // J. Agrobiol. — 2010. — № 27(2). — P. 61–65.

239. North, J.J. Effects of various media compositions on the *in vitro* germination and discoloration of immature embryos of bird of paradise (*Strelitzia reginae*) / J.J. North, P.A. Ndakidemi, C.P. Laubscher // Plant Omics Journal. — 2011. — Vol. 4(2). — P. 100-113.

240. Oliveira, R.P. *In vitro* conservation of diploid banana accessions / R.P. Oliveira, S.O. Silva, K.M. Silva, D.G. Silveira // Scientia Agricola. — 2000. — Vol.57, №2. — P. 245-249.

241. Oliveira Paiva, P.D. Estabelecimento *in vitro* de estrelicia (*Strelitzia reginae* Banks.) / P.D. Oliveira Paiva, R. Paiva, M. Pasqual, L.V. Paiva // Cienc. agrotec., Lavras. — 2004. — Vol. 28, № 5. — P. 1031-1037.

242. Orlikowska, T. Effect of *in vitro* storage at 4° C on survival and proliferation of apple rootstocks / T. Orlikowska // Acta Hort. — 1991. — Vol. 289. — P. 251-253.

243. Palai, S.K. Biochemical changes during *in vitro* organogenesis in *Zingiber officinale* Rosc / S.K. Palai, G.R. Rout, S. Samantaray, P. Das // Journal of Plant Biology. — 2000. — Vol. 27, № 2. — P. 153-160.

244. Pandey, Y.R. *In vitro* propagation of ginger (*Zingiber officinale* Rosc) / Y.R. Pandey, C. Sagwansupyakorn, O. Sahavacharin, N. Thaveechai // Kasetsart J. (Nat Sci). — 1997. — №31. — P. 81-86.

245. Panis, B. Cryopreservation of plant germplasm / B. Panis, R. Swennen, F. Engelmann // Acta Hort. — 2001. — Vol. 560. — P. 79-86.

246. Paulos, M. Effect of IAA and IBA on *In vitro* Rooting of Banana (*Musa paradisiaca*) Cv. Grand Naine / M. Paulos, V.G. Khandagale, B.H.

Nadkarni // International Journal of Science and Research. — 2015. — Vol. 4, Issue 5. — P. 959-962.

247. Pierik, R.L.M. *Anthurium andreanum* plantlets produced from callus tissues cultivated *in vitro* / R.L.M. Pierik // Physiol. Plant. — 1976. — Vol. 37, № 1. — P.80-82.

248. Plant genetic resources network in East Asia: Proceedings of the Meeting for the Regional Network for Conservation and Use of Plant Genetic Resources in East Asia 13 – 16 August 2001, Ulaanbaatar, Mongolia / editors Zhang Z., Zhou M., Rao V.R. — 137 p.

249. Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Eds. Edwin F. Georg, Paul D. Sherrington. 1984. — P. 695.

250. Podwyszyska, M. Micropropagation of *Calathea ornata* Koern. / M. Podwyszyska // Biologia Plantarum. — 1997. — Vol. 39, № 2. — P. 179-186.

251. Poonsapaya, P. Micropropagation of *Zingiber cassumunar* Pixb. / P. Poonsapaya, K. Kraisintu // Acta Hort. (ISHS). — 1993. — № 344. — P. 557-564.

252. Popielarska, M. Histological and sem studied on organogenesis in endosperm-derived callus of kiwifruit (*Actinidia deliciosa* cv. Hayward) / M. Popielarska, H. Ślesak, G. Gyralski // Acta biologica cracoviensia. Series Botanica. — 2006. — Vol. 48/2. — P. 97–104.

253. Prathanturarug, S. *In vitro* propagation of *Zingiber petiolatum* (Holtum) I. Theilade, a rare Zingiberaceous plant from Thailand / S. Prathanturarug, D. Angsumalee, N. Pongsiri, S. Suwacharangoon, T. Jenjittikul // In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant. — 2004. — Vol. 40, № 3. — P. 317-320.

254. Priadi, D. Faktor-Faktor yang mempengaruhi keberhasilan perbanyakan tanaman garut (*Marantas arundinacea* L.) melalui kultur jaringan / D. Priadi, R. Hartati, D.E. Rantau, E. Suudarmonowati // Jurnal Natur Indonesia. — 2000. — Vol. III (1). — P. 19-26.

255. Promtep, K. Embryo and tissue culture of *Strelitzia reginae* ait // Thesis (Ph.D.) - University of the Philippines, College, Laguna. — Sep 1981. — 196 p.

256. Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants / Methods in Molecular Biology. Eds. M. Lambardi, E.A. Ozudogru,

Sh. Mohan Jain. 2013. — Himana Press: Springer: New York: Heidelberg: Dordrecht: London. — 490 p.

257. Puigderrajols, P. Histology of organogenic and embryogenic responses in cotyledons of somatic embryos of *Quercus suber* L. / P. Puigderrajols, C. Celestino, M. Suils, M., Toribio, M. Molinas // Int. J. Plant Sci. — 2000. — Vol. 161(3). — P. 353–362.

258. Punyarani, K.G.J. Micropropagation of *Costus speciosus* (Koen.) Sm. Using Nodal Segment Culture / K.G.J. Punyarani, G.J. Sharma // Not Sci. Biol. — 2010. — Vol. 2 (1) — P. 58-62.

259. Qamar, M. Optimization of *in vitro* multiplication for exotic banana (*Musa* spp.) in Pakistan / M. Qamar, S.T. Qureshi, I.A. Khan, S. Raza // African Journal of Biotechnology. — 2015. — Vol. 14(24). — P. 1989-1995.

260. Rahman, M.Z. *In vitro* response and shoot multiplication of banana with BAP and NAA / M.Z. Rahman, K.M. Nasiruddin, M.A. Amin, M.N. Islam // Asian Journal of Plant Sciences. — 2004. — Vol. 3(4). — P. 406-409.

261. Rahman, M.Z. *In vitro* multiplication and rooting of a dessert banana (*Musa* sp cv. Anupom) / M.Z. Rahman, M.H. Rahman, M.U. Mullah, N. Nahar, R.S. Sultana, M.A. Bari, M. Hossain // Pakistan Journal of Biological Science. — 2005. — № 8. — P. 1298-1302.

262. Rajani, H. *In vitro* response of different explants types on shoot and root development of ginger / H. Rajani, S.S. Patil // Acta Hort. (ISHS). — 2009. — № 829. — P. 349-353.

263. Ramirez-Villalobos, M. Secondary somatic embryogenesis in banana CIEN-BTA-03 (*Musa* Spp. AAAA) and regeneration of plants / M. Ramirez-Villalobos, E. Garcia // Acta Hort. (ISHS). — 2009. — № 829 — P. 45-50.

264. Rao, P.S. Micropropagation of sandalwood (*Santalum album* L.) and mulberry (*Morus indica* L.) / P.S. Rao, V.A. Bapat // Micropropagation of woody plants / Ed. M.R. Ahuja. — Netherlands: Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1993. — P. 317-345.

265. Rao Ramanatha, V. Review. The Use of Biotechnology for Conservation and Utilization of Plant Genetic Resources / V. Rao Ramanatha, W. Rile Kenneth // Plant Genetic Resources Newsletter. — 1994. — № 97. — P. 3-19.

266. Reed, B.M. Cold storage of strawberries *in vitro*: A Comparison of Three Storage Systems / B.M. Reed // Fruit Varieties Journal. – 1992. – V. 46(2). – P. 98-102.

267. Reed, B.M. Vitro conservation of temperate tree fruit and nut crops / B.M. Reed // Plant conservation biotechnology: Edited by Benson E.E. – University of Abertay, Dundee UK. – 1999. – P. 139-153.

268. Reed, B. *In vitro* culture and cryogenic preservation / B. Reed // An Operation Manual for the National Clonal Germplasm Repository. Corvallis, Or., 1999. – P. 46.

269. Reed, B.M. Medium-and long-term storage of *in vitro* cultures of temperate fruit and nut crops / B.M. Reed, Y. Chang // Conservation of Plant Genetic Resources *In Vitro*. – 1997. – Vol. 1. – P. 67-105.

270. Reichel, H. The presence of banana streak virus has been confirmed in plantain (*Musa AAB* Simmonds), sugar cane (*Saccharum officinarum*) and edible canna (*Canna edulis*) in Colombia / H. Reichel, S. Belalcázar, G. Múnera, R. Pérez, E. Arévalo // InfoMusa. – 1996. – Vol 6, №1. – P. 9-12.

271. Rescarolli, C.L.S. Produção de mudas de *Etlingera elatior* (Jack) R.M. Sm. através da cultura de tecidos vegetais *in vitro* / C.L.S. Rescarolli, G.R. Zaffari // Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu. – 2009. – Vol.11, №.2. – P.190-195.

272. Reshmi, C.R. *In vitro* culture establishment techniques from field-grown Heliconia plants / C.R. Reshmi, V.L. Sheela // Asian Journal of Horticulture. – 2010. – Vol. 5, № 1. – P. 76-79.

273. Resmi, L. Plantlet production from the male inflorescence tips of *Musa acuminata* cultivars from South India / L. Resmi, A.S. Nair // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2007. – Vol. 88, № 3. – P. 333-338.

274. Resmi, P. Plantlet regeneration *in vitro* through indirect organogenesis in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) / P. Resmi, M.R. Shylaja, P.A. Nazeem, P.A. Valsala, E.V. Nybe // Recent trends in horticultural biotechnology, Vol. I and II: ICAE national symposium on biotechnological interventions for improvement of horticultural crops: issues and strategies, 10-12 January 2005 г. – Vellanikkara, Kerala, India, 2005. – P. 229-232.

275. Reyes, L.M. Establishment of *in vitro* genebank of colombian cultivars of achira (*Canna edulis* Ker.) / L.M. Reyes, G. Ligarreto, G. Germán Muñoz, P. Bravo, Valbuena. // Hort Science. – 1998. – Vol.33, № 3. – P. 493.

276. Robinson, J.Ph. Micropropagation of *Costus speciosus* (Koem.ex.retz) Sm., an antidiabetic plant by using explants of pseudostems / J.Ph. Robinson, S.J. Britto, V. Balakrishnsn // Botany Research International. – 2009. – Vol.2 (3). – P.182-185.

277. Rodrigues, P.H.V. *In vitro* establishment of *Heliconia rauliniana* (Heliconiaceae) / P.H.V. Rodrigues // Scientia Agricola. – 2005. – Vol. 62(1). – P. 69-71.

278. Rodrigues, P.H.V. Somaclonal variation in micropropagated *Heliconia Bihai* cv. Lobster claw plantlets (Heliconiaceae) / P.H.V. Rodrigues // Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.). – 2008. – Vol. 65, №6. – P. 681-684.

279. Rodrigues, P.H.V. Acclimatization of micropropagated *Heliconia bihai* (Heliconiaceae) plant / P.H.V. Rodrigues, A.M.L.R. Lima, G.M.B. Ambrosano, M.F.B. Dutra // Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.). – 2005. – Vol.62, №3. – P.299-301.

280. Rout, G.R. *In vitro* organogenesis in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) / G.R. Rout, P. Das // Journal of herbs, spices and medicinal plants. – 1997. – Vol. 4, Issue 4. – P. 41-51.

281. Rout, G.R. Determination of genetic stability of micropropagated plants of ginger using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers / G.R. Rout, P. Das, S. Goel, S.N. Raina // Bot. Bull. Acad. Sin. — 1998. — Vol. 39. — P. 23-27.

282. Rout, G.R. Onset of *in vitro* rhizogenesis response and peroxidase activity in *Zingiber officinale* (Zingiberaceae) / G.R. Rout, S.K. Palai, P. Das // Rev. Biol. Trop. — 2001. — Vol. 49(3-4). — P. 965-971.

283. Rout, G.R. Effect of growth regulator and culture conditions on shoot multiplication and rhizome formation in ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) *in vitro* / G.R. Rout, S.K. Palai, S. Samantaray, P. Das. // *In vitro* cellular & developmental biology – Plant. – 2001. — Vol. 37. — № 6. — P. 814-819.

284. Roy, A. Propagation of *Costus speciosus* (Koen.) Sm. through *in vitro* rhizome production / A. Roy, A. Pal // Plant Cell Reports. — 1991. — Vol. 10, № 10. — P. 525-528.

285. Roy, O.S. Micropropagation and field performance of “Malbhog” (*Musa paradisiaca*, AAB group): a popular banana cultivar with high keeping quality of North East India / O.S. Roy, P. Bantawa, S.K. Ghosh, A. Jaime, J.A.T. Silva, P. DebGhosh, T.K. Mondal // Tree and Forestry Science and Biotechnology. — 2010. — Vol. 4, Issue 1. — P. 52-58.

286. Rungjindamai, C. Cryopreservation of *Alpinia nigra* (Gaertn.) Burtt by vitrification-based technique / C. Rungjindamai, K. Thammasiri, N. Chuenboonngarm, T. Jenjittikul // Thai journal of botany. — 2010. — Special Issue 2. — 151-154.

287. Sadik, K. Generation of cell suspensions of East African highland bananas through scalps / K. Sadik, P.R. Rubaihayo, M.J.S. Magambo, M. Pillay // African Journal of Biotechnology. — 2007. — Vol. 6 (11). — P. 1352-1357.

288. Saha-Roy, O. Micropropagation and field performance of ‘Malbhog’ (*Musa paradisiaca*, AAB group): a popular banana cultivar with high keeping quality of North East India / O. Saha-Roy, P. Bantawa, S.K. Ghosh, J.A.T. Silva, P. DebGhosh, T.K. Mondal // Tree and forestry science and biotechnology. — 2010. — Vol. 4. — Special Issue 1. — P. 52-58.

289. Said, E.M. Drought Stress Tolerance and Enhancement of Banana Plantlets *In Vitro* / E.M. Said, R.A. Mahmoud, R. Al-Akshar, G. Safwat // Austin J Biotechnol Bioeng. — 2015. — Vol. 2(2). — P. 1040.

290. Saingproa, B. Clonal propagation through multiple shoot formation from ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) callus and buds / B. Saingproa, K. Kanchanapoom // Suranaree J. Sci. Technol. — 1997. — Vol. 4, №1. — P. 1-5.

291. Sakai, T. The influences of growth regulators and culture medium composition on shoot-tip cultures of edible canna / T. Sakai, K. Imai // Environ. Control Biol. — 2007. — Vol. 45(3). — P. 155-163.

292. Sakhanokho, H.F. First report of plant regeneration via somatic embryogenesis from shoot apex-derived callus of *Hedychium muluense* R.M. Smith /

H.F. Sakhanokho, R.Y. Kelley, K. Rajasekaranc // Journal of crop improvement. — 2008. — Vol. 21, Issue 2. — P. 191 – 200.

293. Sanjaiban, Ch. Effect of paclobutazol and sucrose on growth of torch ginger (*Etlingera elatior* (Jack) R.M.Smith) cultured *in vitro* / Ch. Sanjaiban, A. Chidburee // Agricultural Science Journal. — 2002. — № 33 (1-3). — P. 57-61.

294. Santos, R. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus fertilization on post *in vitro* growth of micropropagated *Zingiber officinale* Roscoe / R. Santos, C.G. Girardi, R. Rosete Pescador, S.L. Stürmer // R. Bras. Ci. Solo. — 2010. — Vol. 34. — P. 765-771.

295. Saravitz, C.H. Histology of *in vitro* adventitious bud development on cotyledons and hypocotyls of fraser fir / C.H. Saravitz, F.A. Blazich, H.V. Amerson // J. Amer. Soc. Hort. Sci. — 1993. — Vol. 118(1). — P.163-167.

296. Satheesh, G. Effect of nutrients and sucrose on microphizome production and diosgenin accumulation on *in vitro* cultures of *Costus speciosus* / G. Satheesh, K. Unnikrishnan, A.V. Raghu, S.P. Geetha, I. Balachandran // Medicinal Plants - Int. Jour. Phytomed. Related Industries. — 2012. — Vol. 4(1). — P. 7–11.

297. Schoofs, H. Competence of scalps for somatic embryogenesis in *Musa* / H. Schoofs, B. Panis, R. Swennen // Acta Hort. — 1998. — № 490 — P. 475-484.

298. Selvakkumar, C. Rapid *in vitro* micropropagation of *Alpinia officinarum* Hance, an important medicinal plant, through rhizome bud explants / C. Selvakkumar, A. Balakrishnan, B.S. Lakshmi // Asian Journal of Plant Sciences. — 2007. — Vol. 6, Issue 8. — P. 1251-1255.

299. Sharma, T.R. High-frequency *in vitro* multiplication of disease-free *Zingiber officinale* Rosc. / T.R. Sharma, B.M. Singh // Plant Cell Reports. — 1997. — № 17. — P. 68–72.

300. Shen, X. Indirect shoot organogenesis and selection of somaclonal variation in *Dieffenbachia*: A dissertation fulfill of the requirements for the degree of doctor philosophy. — Univerrrsity of Florida, 2007. — 87 p.

301. Shibli, R.A. Somatic embryogenesis in the endemic black iris / R.A. Shibli, M.M. Ajlouni // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. — 2000. — Vol. 61. — P. 15-21.

302. Shirani, S. Morphological abnormality among regenerated shoots of banana and plantain (*Musa spp.*) after *in vitro* multiplication with TDZ and BAP from excised shoot-tips / S. Shirani, F. Mahdavi, M. Maziah // African Journal of Biotechnology. — 2009. — Vol. 8 (21). — P. 5755-5761.

303. Shirani, S. Scalp induction rate responses to cytokinins on proliferating shoot-tips of banana cultivars (*Musa spp.*) / S. Shirani, M. Sariah, W. Zakaria, M. Maziah // American Journal of Agricultural and Biological Sciences. — 2010. — Vol. 5 (2). — P. 128-134.

304. Simin, W. *In vitro* propagation of *Maranta arundinacea* and *M. leuconeura* var. *Erythroneura* / W. Simin // Journal of Sichuan normal university (natural science). — 1996. — №2. — C. 22.

305. Singh, N.M. Micropropagation-an *in vitro* technique for the conservation of *Alpinia galanga*/ N.M. Singh, L.A. Chanu, Y.P. Devi, W.R.C. Singh, H. B. Singh // Advances in Applied Science Research. — 2014. — Vol. 5(3). — P. 259-263.

306. Smith, M.A. Comparative Anatomy and Physiology of Microcultured, Seedling and Greenhouse grown Asian White Birch / M.A. Smith, J.P. Palta, B.N. McCown // J.Amer. Soc. Hort. Sci. — 1986. — Vol. 111, № 3. — P. 437 – 442.

307. Soares, D.J. *Cordana versicolor* sp. nov. (dematiaceous hyphomycete) causing leaf-spot on *Canna denudata* (*Cannaceae*) in Brazil, with observations on *Cordana musae* / D.J. Soares, K.L. Nechet, R.W. Barreto // Fungal Diversity. — 2005. — Vol.18. — P. 147-155.

308. Sosa-Rodríguez, F.M. *In vitro* propagation of *Heliconia standley* Macbride in Cuba / F.M. Sosa-Rodríguez, R.S. Ortiz, R.P. Hernández, P.M. Armas, D.S. Guillen // Revista Chapingo. Serie Horticultura. — 2009. — Vol. 15. — №2. — P. 17-23.

309. Souza, E.H. Micropropagation of *Heliconia Rostrata* and *Heliconia Bina* from zygotic embryos / E.H. Souza, T.L. Soares, F.V.D. Souza, J.A. Santos-Serejo // Acta Hort. (ISHS). 2010. — №865. — P. 315-320.

310. Spasić, S.Z. Estimation of meristemoid complexity during *Tacitus bellus* in vitro shoot organogenesis by 2D fractal analysis / S.Z. Spasić, A.L. Mitrović, D. Janošević, S. Budimir // Botanica Serbica. — 2015. — Vol. 39 (2). — P. 137-142.

311. Srangsam, A. Establishment of *in vitro* Culture of *Musa* AA Group 'Kluai Sa' and *Musa* AA Group 'Kluai Leb Mue Nang' and the Analysis of Ploidy Stability / A. Srangsam, K. Kanchanapoom // Science Asia. — 2007. — №33. — P. 437-442.

312. Stanly, C. A comparative study of *Curcuma zedoaria* and *Zingiber zerumbet* plantlet production using different micropropagation systems / C. Stanly, A. Bhatt, C.L. Keng // African Journal of Biotechnology. — 2010. — Vol. 9(28). — P. 4326-4333.

313. Stanly, C. Micropropagation of *Curcuma zedoaria* Rosc. and *Zingiber zerumbet* Smith / C. Stanly, C.L. Keng // Biotechnology. — 2007. — Vol. 6(4). — P. 555-560.

314. Stirbet, A. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient, J. Photochem. / A. Stirbet, Govindjee // Photobiol. B: Biol. — 2011. — P. 1-22.

315. Sujatha, R. Histology of organogenesis from callus cultures of black pepper (*Piper nigrum* L.) / R. Sujatha, L.C. Babu, P.A. Nazeem // Journal of Tropical Agriculture. — 2003. — Vol. 41. — P. 16-19.

316. Sultan, T. *In vitro* plant regeneration from male flowers of banana / T. Sultan, M.H. Khan, L. Hakim, A. Mamun, A. Morshed, R. Islam // International Journal of Biosciences. — 2011. — Vol. 1, Issue: 1. — P. 1.

317. Suma, B. Agrobacterium tumefaciens mediated transformation and regeneration of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) / B. Suma, R. Keshavachandran, E.V. Nybe // Journal of Tropical Agriculture. — 2008. — Vol. 46 (1-2). — P. 38-44.

318. Tanprasert, P. Detection, identification and antibiotic treatment of bacterial contaminants from micropropagated strawberries: A thesis submitted to Oregon State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science. — Oregon State University, 1996. — 91 c.

319. Tevfik, A.Sh. Biotechnology approaches of Canna (*Canna*×*hybrida hort.*) clonal micropropagation / A.Sh. Tevfik, I.V. Mitrofanova, T.V. Kuzmina // the VI International Scientific and Practical Conference «Biotechnology as an instrument for

plant biodiversity conservation physiological, biochemical, genetic and legal aspects». Book of Abstracts (12-17 October 2014). – Yalta. – P. 111.

320. Tevfik, A.Sh. The biotechnology approaches of Canna (*Canna*×*hybrida hort.*) regenerants obtaining / A.Sh. Tevfik, I.V. Mitrofanova, O.V. Mitrofanova, N.P. Lesnicova-Sedoshenko, V.A. Brailko // Production and Establishment of Micropropagated plants 6th International ISHS Symposium. Book of Abstracts (19-24 April 2015) Grand Hotel Londra. – Sanremo. Italy. – P. 201.

321. Titov, S. Control of phenolic compound secretion and effect of growth regulators for organ formation from *Musa spp.* cv. Kanthali floral bud explants / S.Titov, S.K. Bhowmik, A. Mandal, S. Alam, S.N. Uddin // American Journal of Biochemistry and Biotechnology. – 2006. – Vol. 2, Issue 3. – P. 97-104.

322. Toshinari, G. *In vitro* germplasm preservation of Lily species utilizing callus cultures at low temperature / G. Toshinari, M. Masahiro // Acta Hort. – 2001. – Vol. 560. – P. 153-155.

323. Tripathi, B.K. *In vitro* plant regeneration of *Hedychium roxburghii* Blume through rhizome-meristem culture / B.K. Tripathi, C. Billaton // Plant Cell Tissue Organ culture. – 1985. – №4. – P. 11-17.

324. Tyagi, R.K. Conservation of Zingiber germplasm through *in vitro* rhizome formation / R.K. Tyagi, A. Agrawal, A. Yusuf // Scientia Horticulturae. – 2006. – Vol. 108, Issue 2. – P. 210-219.

325. Uddin, S.N. *In vitro* Propagation of Banana (*Musa sp.* Cv. Kanthali): An Endogenous Variety of Bangladesh with Controlling Bacterial Contaminations / S.N. Uddin, S. Titov, A. Wadud // American Journal of Plant Physiology. – 2006. – Vol. 1, Issue 2. – P. 169.

326. Ulisses, C. Induction of somatic embryogenesis in *Heliconia chartacea* Lane ex Barreiros cv. Sexy pink and cv. Sexy scarlet from sections of ovaries / C. Ulisses, T. Camara, L. Willadino, C. Albuquerque // Rev. Bras. Ciencias Agrarias. – 2007. – Vol. 2, №4. – P. 281-284.

327. Vega, R. Histology of somatic embryogenesis in rice (*Oryza sativa* cv. 5272) / R. Vega, N. Vásquez, A.M. Espinoza, A.M. Gatica, M. Valdez-Melara // Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. – 2009. – Vol. 57. – P. 141-150.

328. Venkatachalam, L. Genetic analyses of micropropagated and regenerated plantlets of banana as assessed by RAPD and ISSR markers / L. Venkatachalam, R.V. Sreedhar, N. Bhagyalakshmi // *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant.* — 2007. — Vol. 43, №3. — P. 267-274.

329. Venkatachalam, L. Micropropagation in banana using high levels of cytokinins does not involve any genetic changes as revealed by RAPD and ISSR markers / / L. Venkatachalam, R.V. Sreedhar, N. Bhagyalakshmi // *Plant Growth Regulation.* — 2007. — Vol. 51, № 3. — P. 193-205.

330. Victyrio, C.P. Leaf and root volatiles produced by tissue cultures of *Alpinia zerumbet* (pers.) Burt and Smith under the influence of different plant growth regulators / C.P. Victyrio, M. Kuster R., C.L.S. Lage // *Quim. Nova.* — 2011. — Vol. 34, № 3. — P. 430-433.

331. Villamor, C.C. Influence of media strength and sources of nitrogen on micropropagation of ginger *Zingiber officinale* Rosc. / C.C. Villamor // *E-International Scientific Research Journal.* — 2010. — Vol. 2. — Issue 2. — P. 150-155.

332. Wang, D. Research on shoot-tip culture of *Canna* × *generalis* / D. Wang, J. Lei, Y. Wu, H Lü, J. Yu // *Subtropical Plant Science.* — 2008. — Vol.1. — P.9.

333. White, P.R. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium / P.R. White // *Plant. Physiol.* — 1934. — Vol. 9. — P. 585-600.

334. Withers, L.A. The test tube genebank – a safe alternative to field conservation / L.A. Withers, J.M.M. Engels // *IBPGR Newsletter for Asia and the Pasific.* — 1990. — №3. — P. 1-2.

335. Wong, W.C. *In vitro* propagation of banana (*Musa* spp.): initiation, proliferation and development of shoot-tip cultures on defined media / W.C. Wong // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* — 1985. — Vol. 6. — № 2. — P. 159-166.

336. Xiong, Y. Tissue culture and rapid propagation of zygotic embryo of *Hedychium forrestii* / Y. Xiong, G. Ma, N. Liu, B. Huang // Guihaia. — 2005. — № 3. — P.11.

337. Xuan, P. Study on tissue culture and rapid propagation of ginger (*Zingiber officinale*) / P. Xuan, G. Yuan-lin, Y. Chun-fan, Y. Chun-rong // Southwest China Journal of Agricultural Sciences. — 2004. — №4. — P. 18.

338. Yin, F. Study *in vitro* Culture and Rapid Propagation of *Calathea rotundifolia* cv. Fasciata / F. Yin, J. Zhu, H. Wang // Journal of Beijing City University. — 2009. — №2. — P. 14.

339. Youmbi, E. Expression *in vitro* des capacités organogéniques des bourgeons axillaires chez le bananier plantain (*Musa spp.*) / E. Youmbi, D. Ngaha // Fruits. — 2004. — 59. — P. 241-248.

340. Yunus, M.F. *In vitro* propagation of *Etlingera elatior* (Jack) (torch ginger) / M.F. Yunus, M.A. Aziz, M.A. Kadir, A.A. Rashid // Scientia Horticulturae. — 2012. — Vol. 135. — P. 145–150.

341. Zaidan, H.A. Comportamento fisiológico *in vitro* de bananeira (*Musa sp.*, AAA e AAB) cvs. Nanica e Prata anã: influência de diferentes níveis de potássio / H.A. Zaidan, E.T. Oliveira, L.A. Gallo, O.J. Crocomo // Sci. agric. — 1999. — Vol. 56, № 2. — P. 397-406.

342. Zhang, C. *In vitro* culture and rapid propagation of *Calathea roseopicta* / C. Zhang, B. Yang, L. Chen, T. Lan, W. Zeng, X. Zhou // Guangdong Agricultural Science. — 2008. — №3. — P. 12.

343. Zhang, Z. The sifting of optimum conditions for rapid propagation of *M. leuconeura* var. Kerchoveana / Z. Zhang, C.T.W. Dai // Journal of Sichuan Normal University (Natural Science). — 1990. — Vol.2. — P.18.

344. Zhang, Z. Study on Techniques of tissue culture and rapid propagation of *Calathea leopardina* / Z. Zhang, X. Hu, Sh. Zhang, J. Wang, Y. Li // Gansu Agricultural Science and Technology. — 2007. — №8 — P. 3.

345. Zhao, Ya. The rapid propagation techniques of *Maranta arundinacea* / Ya. Zhao, F. LV, Ya. Zhang, M. Zhang // Northern Horticulture. — 2009. — №7. — P.89.

346. Zheng, Y. Increasing *in vitro* microrhizome production of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) / Y. Zheng, Y. Liu, M. Ma, K. Xu // Acta Physiologiae Plantarum. — 2008. — Vol. 30. — № 4. — P. 513-519.

347. Ziv, M. Control of oxidative browning and *in vitro* propagation of *Strelitzia reginae* Ait. / M. Ziv, A.H. Halevy // Hort. Sci. — 1983. — Vol. 18. — P. 434-436.

348. Ziv, M. Flowering of geophytes *in vitro* / M. Ziv, V. Naor // Propagation of Ornamental Plants. — 2006. — Vol. 6, № 1. — P. 3-16.

349. Sharifah Nurashikin Wafa, Rosna Mat Taha, Sadegh Mohajer, Noraini Mahmad and Bakrudeen Ali Ahmed. Organogenesis and Ultrastructural Features of in vitro grown *Canna indica* L. BioMed Research International Volume 2016 (2016), Article ID 2820454, 9 p.

Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2820454>

350. Rozali, S. E. Micropropagation of an exotic ornamental plant, *Calathea crotalifera*, for production of high quality plantlets / S.E. Rozali, K.A. Rashid, R. M. Taha // The Scientific World Journal. Volume 2014, Article ID 457092, 12 p.

Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/457092>

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А.1.

Морфометрическая характеристика коробочек и семян различных сортов канны садовой

Показатели	Дар Востока	Ливадия	Президент	Суевия
Средняя длина крупной коробочки, см	3,27±0,22	—*	—	—
Средняя длина мелкой коробочки, см	1,58±0,17	1,35±0,07	1,11±0,04	2,26±0,09
Средний диаметр крупной коробочки, см	2,90±0,11	2,02±0,13	—	—
Средний диаметр мелкой коробочки, см	1,45±0,11	1,29±0,05	1,43±0,04	1,59±0,06
Вес коробочки, г	6,91±1,03	0,76±0,10	1,11±0,03	1,38±0,06
Количество крупных семян в 1 коробочке, шт	2,80±0,42	1,98±0,25	—	—
Количество мелких семян в 1 коробочке, шт	16,25±1,09	19,00±2,15	24,60±1,61	34,80±1,95
Средняя длина крупного семени, см	1,08±0,04	—	—	—
Средний диаметр крупного семени, см	0,78±0,04	—	—	—
Вес крупного семени, г	0,64±0,01	—	—	—

* — не сформировались

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

ВЛИЯНИЕ СРОКОВ ОТБОРА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ЧАСТОТУ КОНТАМИНАЦИИ ЭКСПЛАНТОВ КАННЫ САДОВОЙ

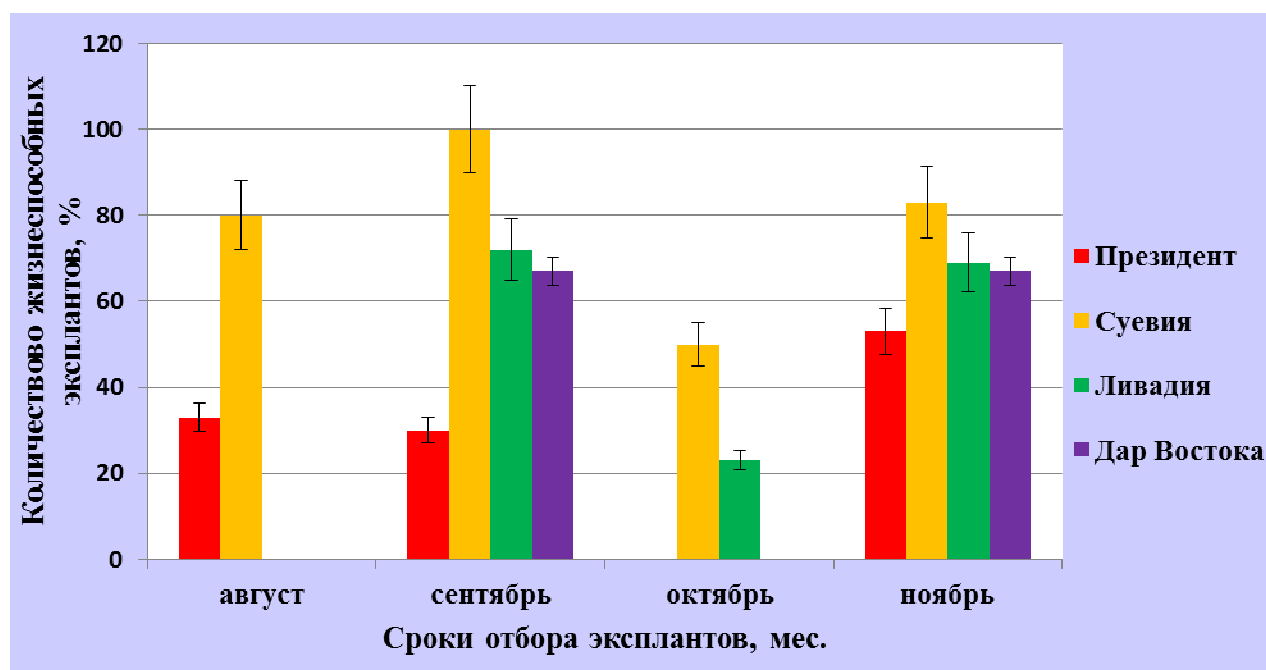


Рис. Б.1. Зависимость количества жизнеспособных эксплантов канны садовой от сроков отбора (экспланты канны садовой сорта Ливадия в августе не вводили в условия *in vitro*)

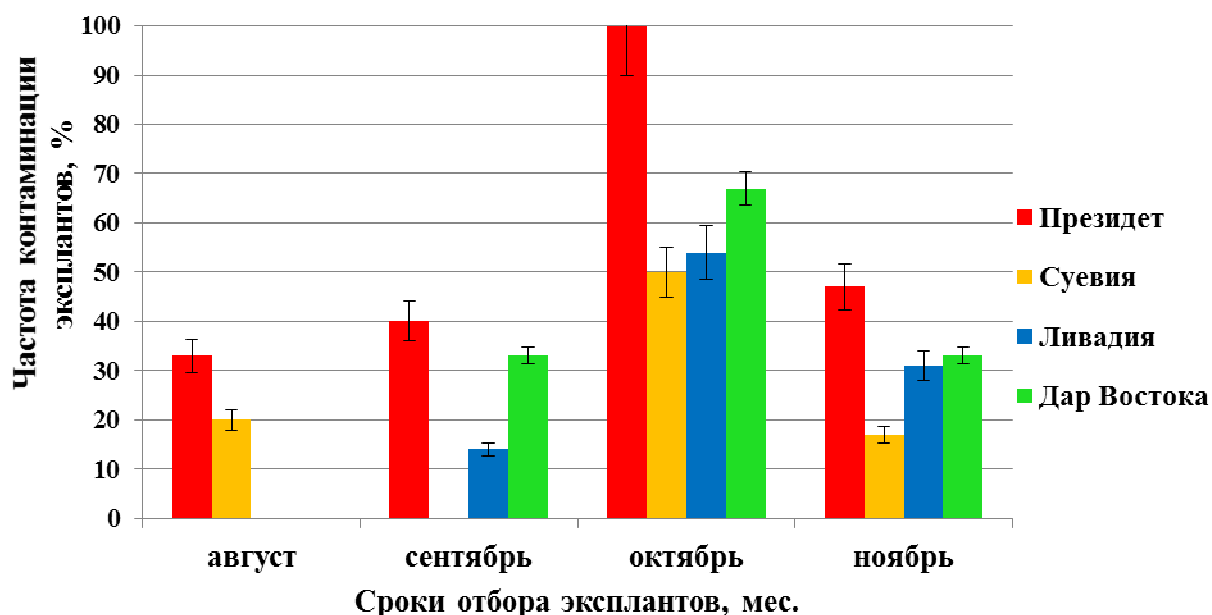


Рис. Б.2. Зависимость частоты контаминации эксплантов канны садовой от сроков отбора (экспланты канны садовой сорта Ливадия в августе не вводили в условия *in vitro*)

ПРИЛОЖЕНИЕ В

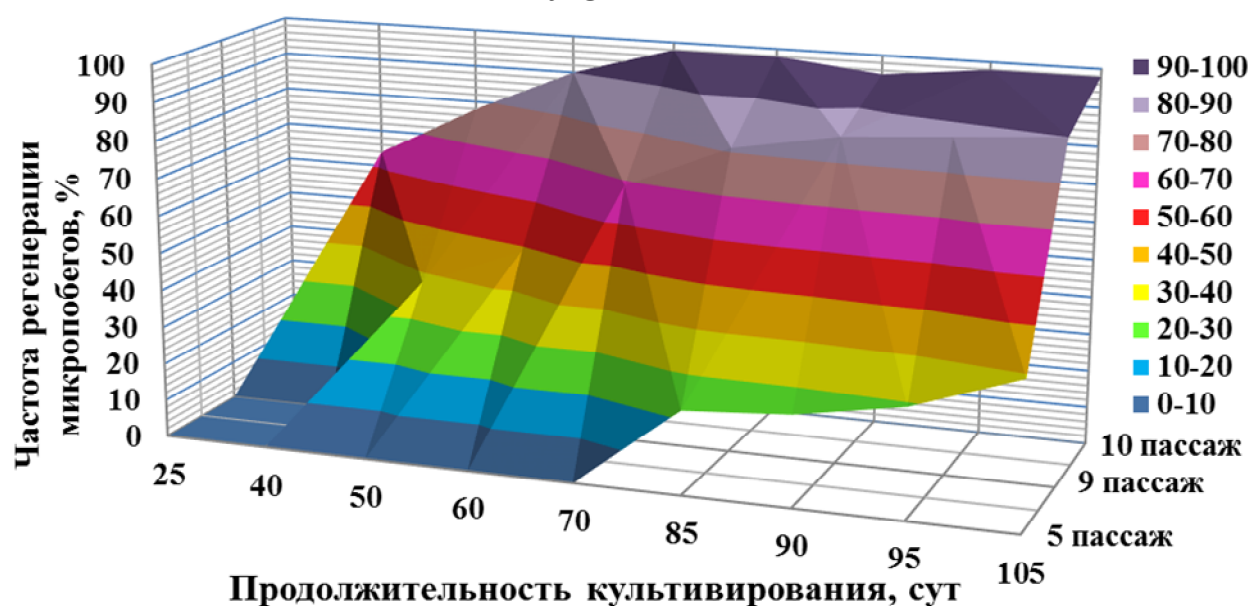


Рис. В.1. Влияние количества субкультивирований после введения в культуру *in vitro* и продолжительности культивирования на среде МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК на частоту регенерации меристематических канн садовой сорта Ливадия

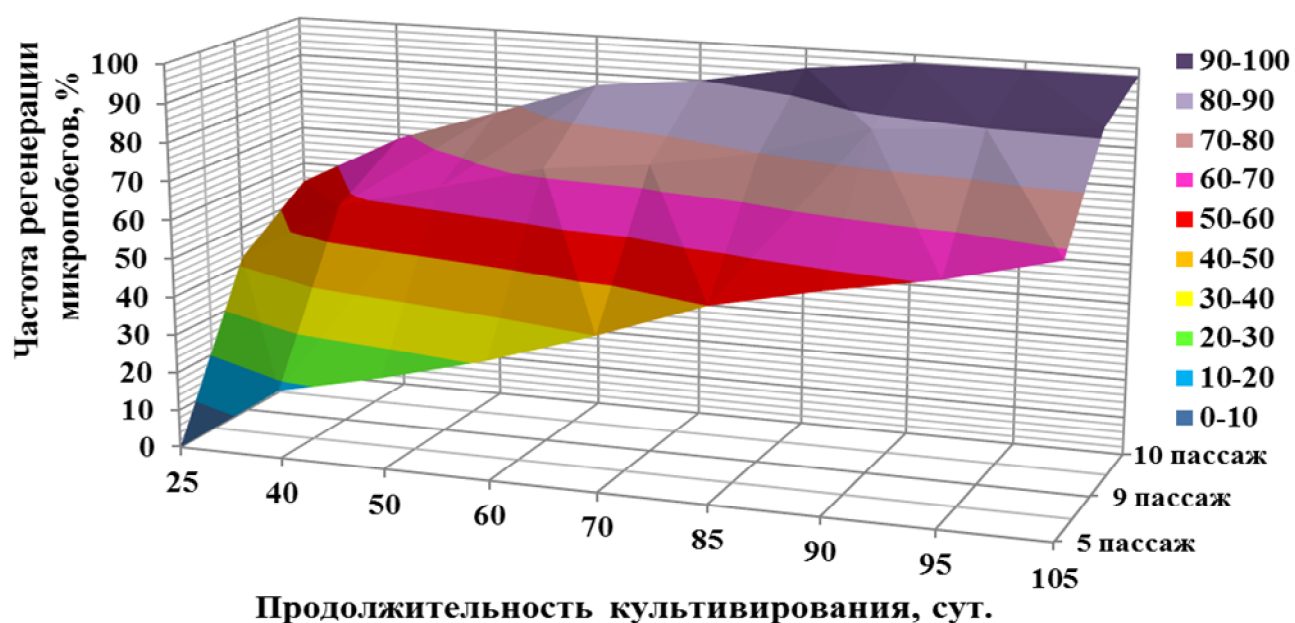


Рис. В.2. Влияние количества субкультивирований после введения в культуру *in vitro* и продолжительности культивирования на питательной среде WPM с 0,75 мг/л БАП на частоту регенерации меристематических канн садовой сорта Ливадия

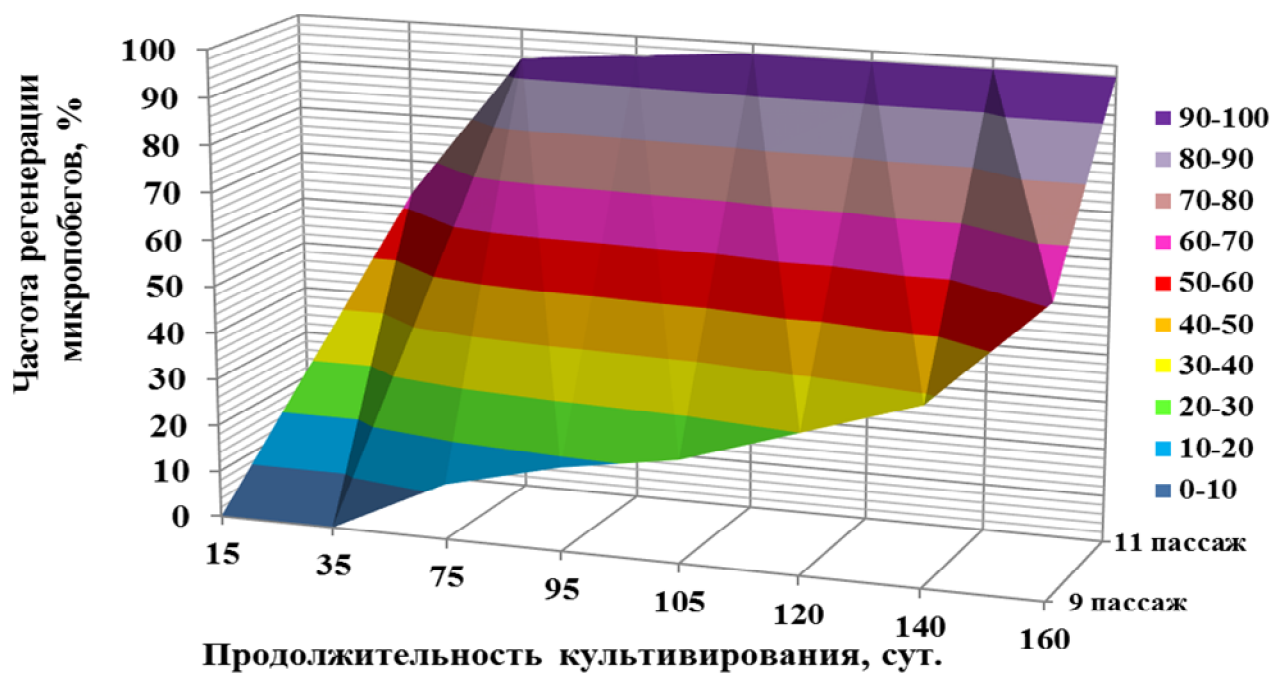
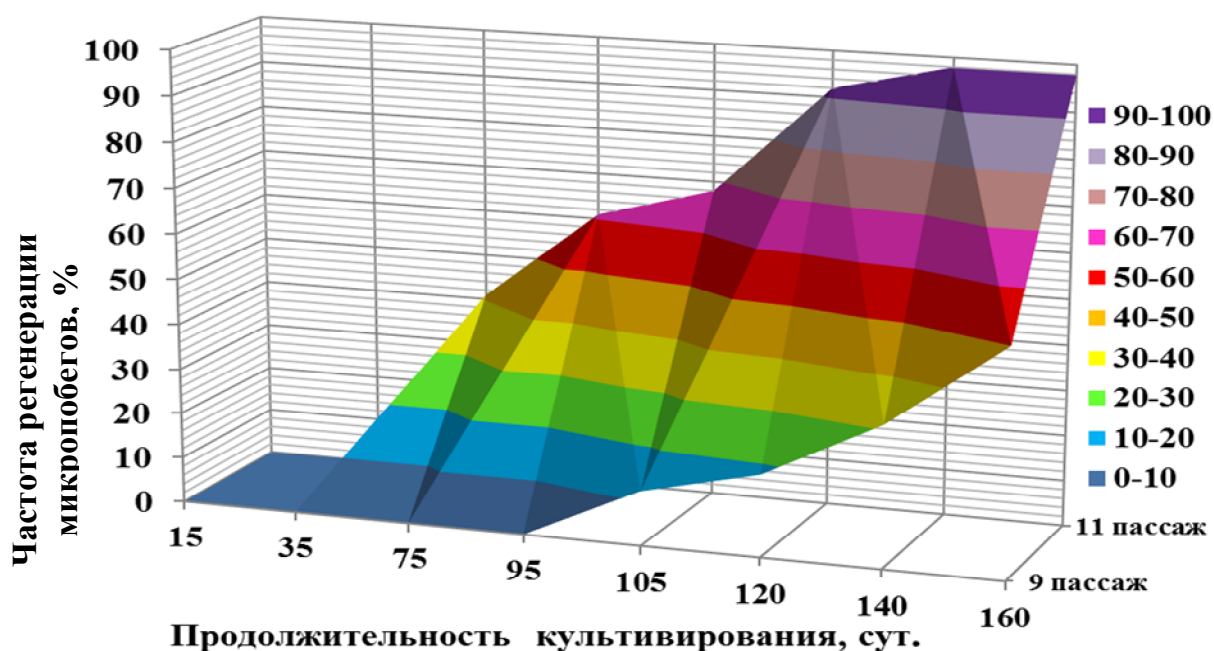


Рис. В.3. Влияние количества субкультивирований после введения в культуру *in vitro* и продолжительности культивирования на питательной среде МС с 1,5 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК на частоту регенерации меристемоидов канны садовой сорта Суевия



Р

ис. В.4. Влияние количества субкультивирований после введения в культуру *in vitro* и продолжительности культивирования на питательной среде МС с 2-4 мг/л БАП и 1 мг/л ГК₃ на частоту регенерации меристемоидов канны садовой сорта Суевия

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

ТИПЫ ЭКСПЛАНТОВ, ОБЛАЮЩИЕ НИЗКИМ

МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ

Таблица Г.1

Жизнеспособность (%) недозрелых семян в зависимости от содержания регуляторов роста в питательной среде и продолжительности культивирования

Сорт, полученный от свободного опыления	RG1 (МС + 1,5 мг/л БАП + 1,5 мг/л НУК)		RG2 (МС + 2 мг/л БАП + 1,75 мг/л ИУК)		RG3 (МС + 2 мг/л БАП + 2 мг/л ИУК)		RG4 (МС + 6 мкМ ТДЗ)	
	на 7-е сут	на 21-е сут	на 7-е сут	на 21-е сут	на 7-е сут	на 21-е сут	на 7-е сут	на 21-е сут
Дар Востока	60±6,7	17±2,0	57±4,8	43±4,7	73±8,1	43±4,4	100	64±7,1
Ливадия	100	42±5,1	75±10,5	53±6,1	75±8,5	64±7,1	67±7,8	27±3,2
Президент	73±9,2	17±2,2	100	0	63±6,9	20±2,2	43±5,2	7±1,0
Суевия	30±3,2	14±1,9	56±5,1	25±3,1	50±4,3	0	40±4,7	0

Таблица Г.2

Влияние условий культивирования и состава питательной среды на жизнеспособность эксплантов (недозрелых семян), %

Сорт, полученный от свободного опыления	Питательная среда							
	Монье				Мурасиге Скуга			
	на 7-е сут		на 14-е сут		на 7-е сут		на 14-е сут	
	в холо- дильнике	на свету	в холо- дильнике	на свету	в холо- дильнике	на свету	в холо- дильник е	на свету
Дар Востока	80±7,8	—	50±4,3	—	34±4,1	—	11±0,9	—
Ливадия	75±6,2	—	17±2,1	—	50±4,3	—	33±4,1	—
Президент	34±4,0	20±2,2	20±1,7	25±2,1	50±4,3	0	0	0
Суевия	60±5,3	100	50±6,1	50±4,9	60±6,3	100	41,5±5,2	22±2,3

* – растительный материал не вводили

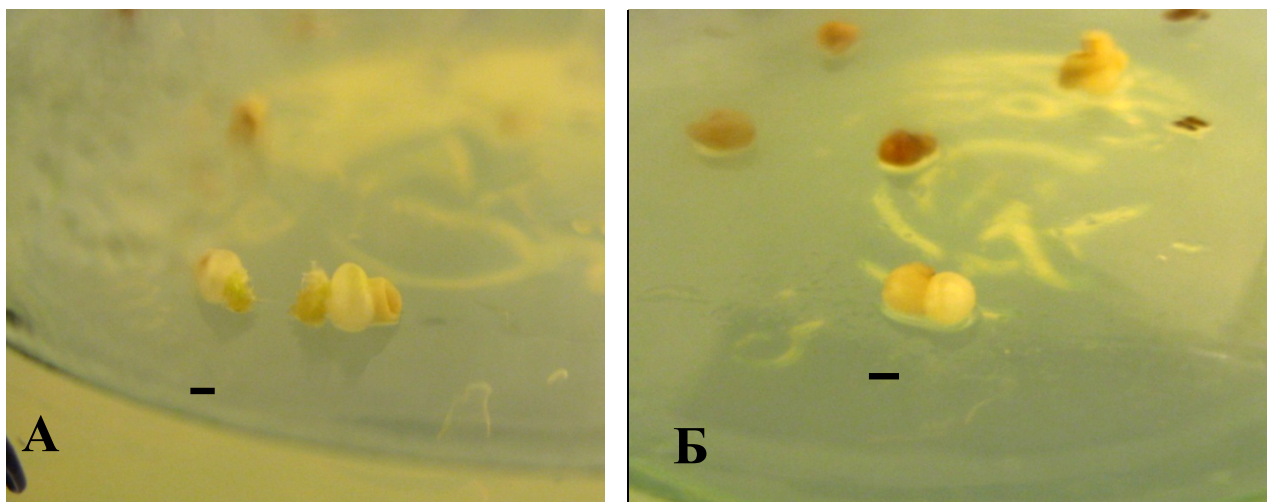


Рис. Г.1. Недозрелые набухшие семена на 15 сут культивирования на питательной среде RG3 (масштаб 1мм): А) сорта Ливадия (от свободного опыления); Б) сорта Президент (от свободного опыления)

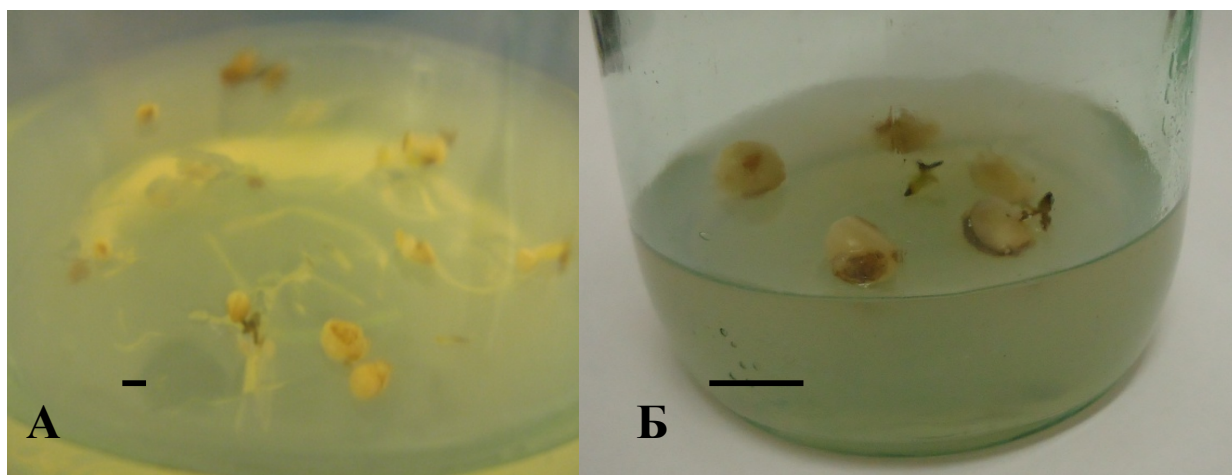


Рис. Г.2. Культивирование семян канны садовой: А) недоразвитые семена сорта Президент (от свободного опыления) (масштаб 1 мм); Б) семена сорта Дар Востока (от свободного опыления) (масштаб 1 см)

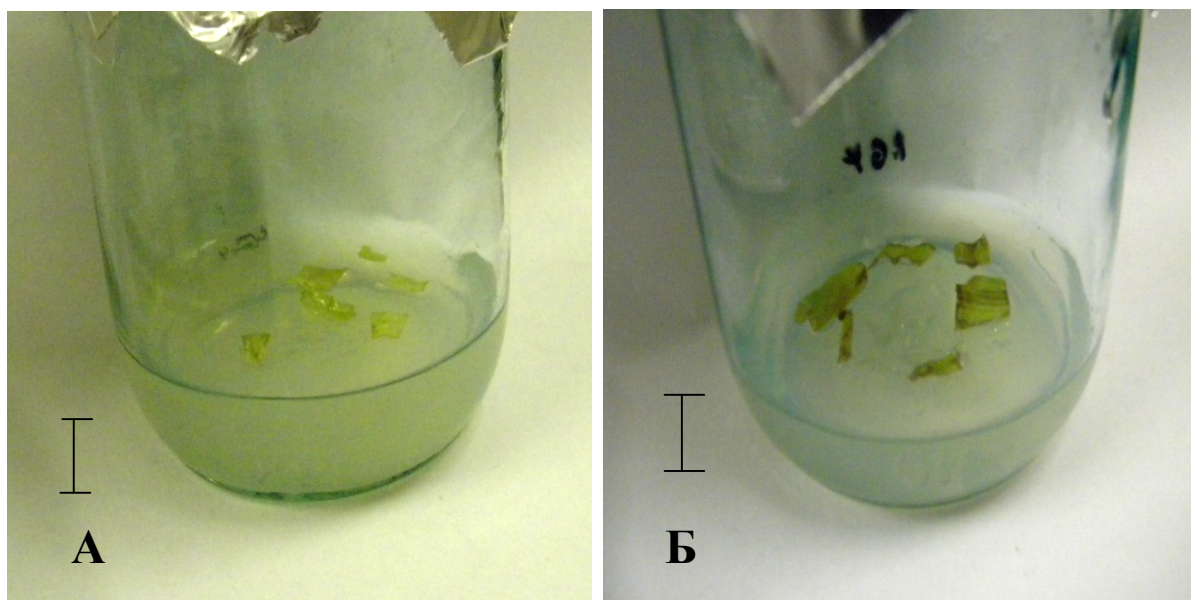


Рис. Г.3. Высечки листа канны садовой сорта Суевия: А) на 7-е сутки культивирования; Б) потемнение эксплантов на 21-е сутки культивирования (масштаб 1 см)

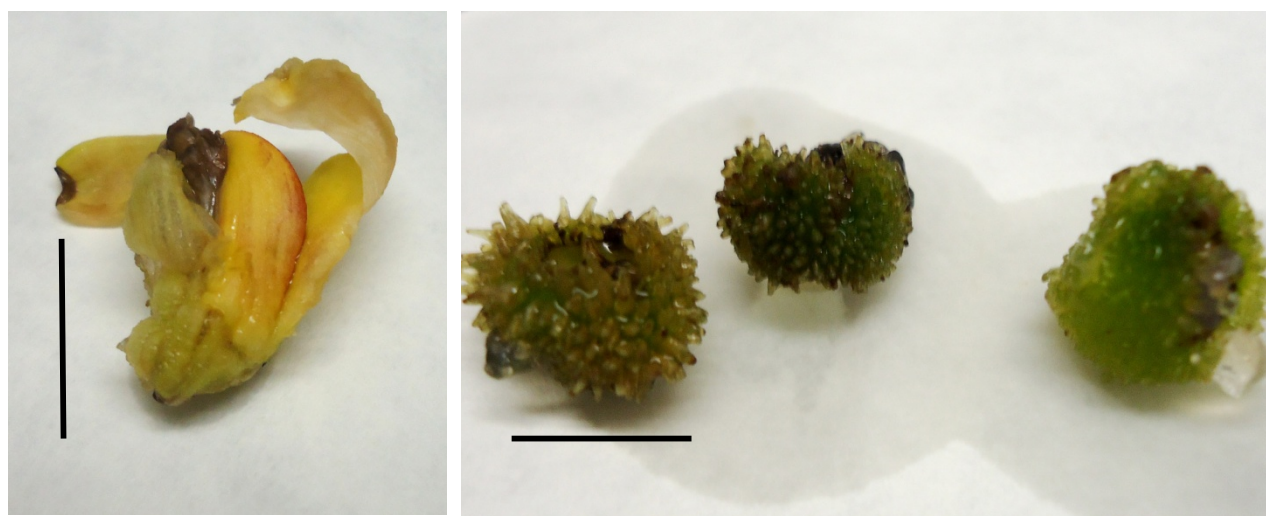


Рис. Г.4. Разрастание тканей эксплантов на 20-е сутки культивирования: А) сегментов бутонов сорта Дар Востока на питательной среде МС с 1 мг/л 2,4-Д и 0,25 мг/л кинетина; Б) сегментов завязи сорта Перезидент на питательной среде МС с 1 мг/л БАП и 1 мг/л ИУК (масштаб 1 см)

ПРИЛОЖЕНИЕ Д
ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДОМ
ПОЛЯРИЗАЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ КРАХМАЛЬНЫХ ЗЕРЕН
ТКАНЕЙ СЕМЯДОЛИ КАННЫ САДОВОЙ

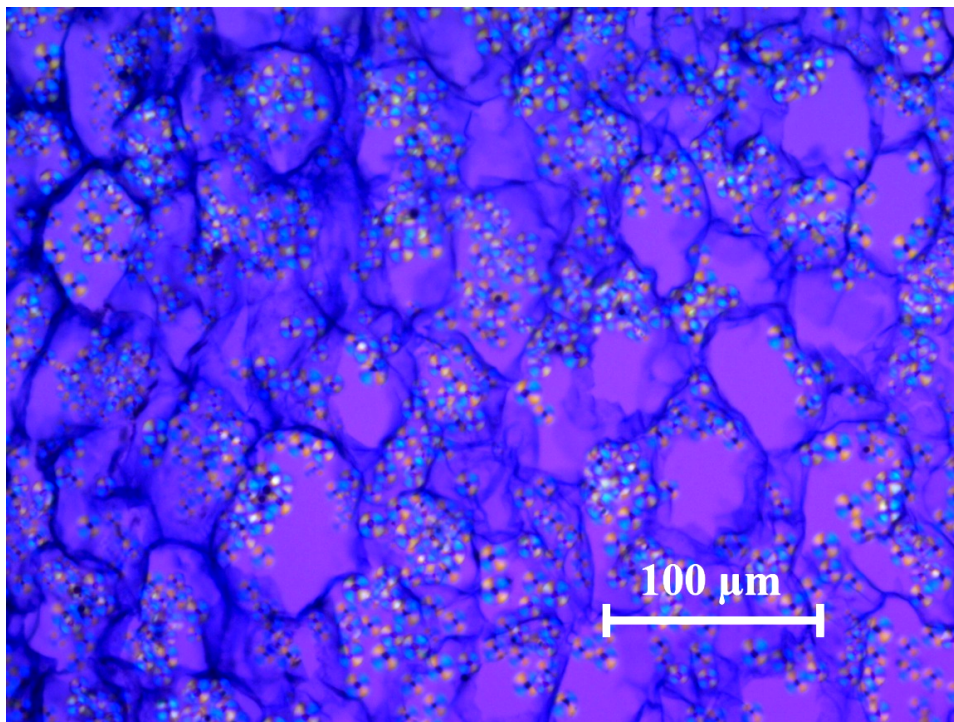


Рис. Д.1. Сорт Дар Востока (от свободного опыления)

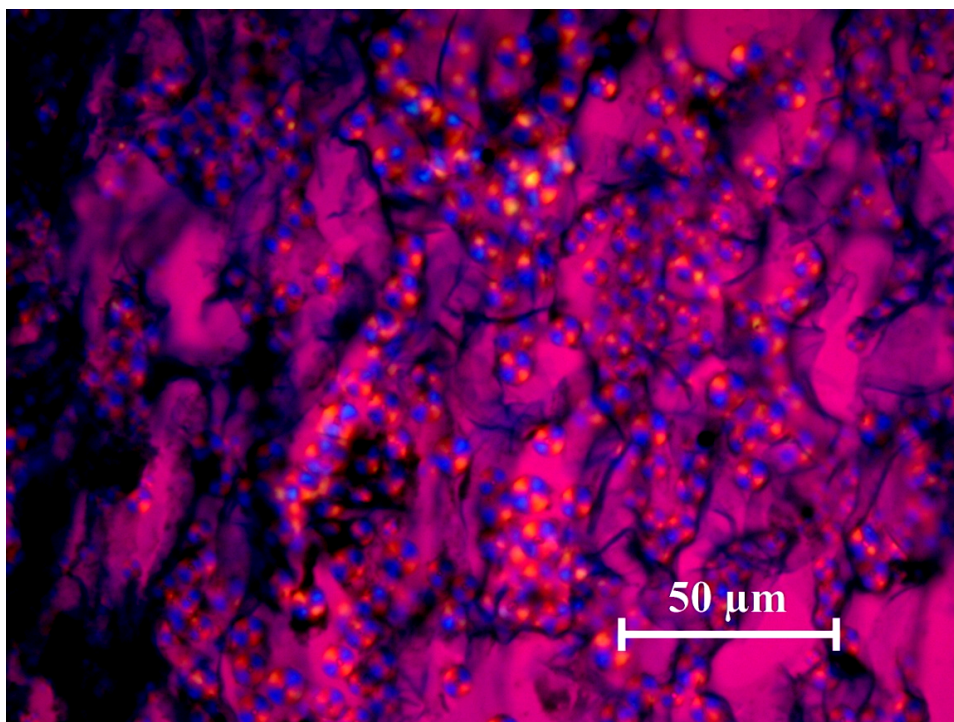


Рис. Д.2. Сорт Ливадия (от свободного опыления)