

**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации**  
**Российская Академия Наук**  
**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки**  
**«Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Крыма»**

**Егорова Н. А.**

**БИОТЕХНОЛОГИЯ**  
**ЭФИРОМАСЛИЧНЫХ РАСТЕНИЙ:**  
**СОЗДАНИЕ НОВЫХ ФОРМ И**  
**МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ *IN VITRO***

Симферополь  
Издательский Дом «Автограф»  
2021

**Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation  
Russian Academy of Sciences  
Federal State Budget Scientific Institution  
“Research Institute of Agriculture of Crimea”**

**Yegorova N. A.**

**BIONECHNOLOGY OF ESSENTIAL OIL  
PLANTS: CREATION OF NEW FORMS  
AND MICROPROPAGATION *IN VITRO***

Simferopol  
Publishing House «Autograph»  
2021

УДК 633.81:57.085.2  
ББК – 41.3  
Е 30

*Утверждено к печати Ученым советом ФГБУН «НИИСХ Крыма» (Протокол №1 от 15 января 2021 г.)*

**Рецензенты:**

**Харченко П.Н.** – академик РАН, РАСХН, доктор биол. наук, профессор, ФГБНУ «ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии»

**Митрофанова И.В.** – чл.-корр. РАН, доктор биол. наук, ФГБУН «Ордена Трудового Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН»

**Мельничук Т.Н.** – доктор с.-х. наук, старший научный сотрудник, ФГБУН «НИИСХ Крыма»

**Егорова Н.А.** Биотехнология эфиромасличных растений: создание новых форм и микроразмножение *in vitro*. – Симферополь: ИД «Автограф», 2021. – 315 с.

ISBN 978-5-6045452-9-4

В монографии обобщены результаты многолетних исследований процессов индукции каллусо- и морфогенеза, получения растений-регенерантов, накопления вторичных метаболитов *in vitro* у лаванды узколистной, шалфея мускатного, розы эфиромасличной, кориандра посевного, фенхеля обыкновенного, аниса обыкновенного, видов тысячелистника и герани эфиромасличной. Рассмотрены вопросы разработки клеточных технологий создания нового исходного селекционного материала с использованием соматональной изменчивости, мутагенеза, клеточной селекции *in vitro* и приемов клонального микроразмножения у эфиромасличных растений. Монография предназначена для специалистов в области биотехнологии, ботаники, физиологии и селекции растений, а также для аспирантов и студентов высших учебных заведений.

УДК 633.81:57.085.2  
ББК – 41.3

ФГБУН «НИИСХ Крыма», 2021  
Н.А. Егорова, 2021  
ИД «Автограф», 2021

ISBN 978-5-6045452-9-4

В монографии представлены результаты многолетних исследований, посвященных разработке комплексных биотехнологических систем создания новых форм и клонального микроразмножения эфиромасличных растений – лаванды (*Lavandula angustifolia* Mill.), шалфея (*Salvia sclarea* L.), кориандра (*Coriandrum sativum* L.), фенхеля (*Foeniculum vulgare* Mill.), аниса (*Anisum vulgare* Gaerth.), тысячелистника (*Achillea* spp.), розы эфиромасличной (*Rosa* spp.) и герани эфиромасличной (*Pelargonium* spp.). Эти биотехнологии основаны на изучении особенностей культивирования изолированных органов, каллусных тканей и индукции морфогенеза *in vitro*.

Глава 1 посвящена общей информации, касающейся методов клеточной инженерии, которые позволяют создавать новые генотипы и размножать их *in vitro*. В следующих главах представлены биотехнологические исследования, проведенные в ФГБУН «НИИСХ Крыма» (ранее Институт эфиромасличных и лекарственных растений) с использованием эфиромасличных растений, преимущественно выращиваемых на юге России (лаванда, кориандр, шалфей, фенхель, анис, тысячелистник, роза и др.). Представлены данные об оптимизации условий получения каллусных культур из различных типов эксплантов и особенностях влияния экзогенных и эндогенных факторов на эффективность каллусогенеза у изученных эфиромасличных растений. Разработаны методы регенерации растений из каллусов разных пассажей для более, чем 50 сортов и образцов лаванды, шалфея, кориандра, аниса, фенхеля, герани и тысячелистника. Определены закономерности влияния генотипа, гормонального состава питательной среды, типа экспланта и количества пассажей на индукцию процесса морфогенеза. Выявлены приемы, позволяющие повысить частоту органогенеза и соматического эмбриогенеза в каллусных культурах и регенерировать растения в течение 1-3 лет. Вместе с тем оптимизирована методика получения гибридов розы эфиромасличной с использованием эмбриокультуры и их микроразмножения. Установлены особенности действия абиотических стрессовых факторов на различные биотехнологические объекты (морфогенные или неморфогенные каллусы и зиготические зародыши). Впервые для лаванды, шалфея, герани и кориандра разработаны селективные системы *in vitro* для отбора форм, устойчивых к засолению, осмотическому и низкотемпературному стрессам. Для лаванды, герани, тысячелистника, фенхеля, розы и шалфея оптимизированы методы клонального микроразмножения. При этом показано влияние на

эффективность размножения сорта, состава питательной среды, расположения экспланта на побеге и количества субкультивирований. При анализе регенерантов, полученных из каллусов лаванды, шалфея, герани, кориандра, тысячелистника и фенхеля, выявлена соматоклональная вариабельность по морфологии и экономически важным признакам, и выделены перспективные для селекции формы. Одним из практических результатов исследований явилось получение нового сорта шалфея мускатного Селинж, который был создан с использованием соматоклональных вариантов.

**Ключевые слова:** эфиромасличные растения, биотехнология, каллусогенез, морфогенез, регенерант, соматоклональная вариабельность, селекция *in vitro*, эмбриокультура, клональное микроразмножение, лаванда, шалфей, роза, кориандр, фенхель, анис, тысячелистник, герань.

This monograph presents the results of many years research devoted to the development of complex biotechnological systems of creation the new forms and clonal micropropagation of such essential oil plants as lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.), sage (*Salvia sclarea* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.), fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.), anise (*Anisum vulgare* Gaerth.), yarrow (*Achillea* spp.), essential oil rose (*Rosa* spp.) and geranium (*Pelargonium* spp.). These biotechnologies are based on the investigation of features of isolated organs, callus tissues cultivation and morphogenesis induction *in vitro*.

Chapter I deals with the general information on the methods of cell engineering that allow creating new plant genotypes and propagating them *in vitro*. The following Chapters summarize biotechnological research carried out at the Research Institute of Agriculture of Crimea (the former the Institute of Essential Oil and Medicinal Plants), using aromatic plant species, mainly grown in southern Russia (lavender, coriander, sage, fennel, rose yarrow etc.). The conditions of callus cultures obtaining from different explants were optimized and peculiarities of exogenous and endogenous factors effects on the callusogenesis efficiency of studied essential oil plants were detected. The methods of plant regeneration from calluses of different passages for more than fifty cultivars and samples of lavender, sage, coriander, fennel, anise, geranium, yarrow have been developed. The peculiarities of genotype, hormonal composition of culture medium, type of explant and number of passage influence on the morphogenesis induction have been determined. The means,

which permit to increase the frequency of organogenesis and somatic embryogenesis of callus cultures and to regenerate the plants during 1-3 years, were revealed. Furthermore, the method for creating essential oil rose hybrids using embryo culture and clonal micropropagation *in vitro* was developed. The peculiarities of abiotic stress factors effect at different biotechnological objects (calluses with and without morphogenesis and zygotic embryos) have been revealed. For the first time, the selective systems *in vitro* for screening forms with resistance to salinity, osmotic and low temperature stress have been elaborated for lavender, sage, geranium, coriander. For lavender, geranium, yarrow, fennel, rose and sage, methods of clonal micropropagation have also been created. The influence of cultivar, medium composition, explant disposition on the shoot and number of subcultivations on the propagation efficiency was shown. Based on the analysis of the regenerants from lavender, sage, geranium, coriander, yarrow and fennel calluses, the somaclonal variability by morphology and economic valuable characteristics have been determined, and prospects for breeding forms have been revealed. One of the practical results of these scientific studies is a new cultivar of clary sage Selinzh, which was created using somaclonal variants.

**Keywords:** essential oil plants, biotechnology, callusogenesis, morphogenesis, regenerant, somaclonal variability, selection *in vitro*, embryoculture, clonal micropropagation, lavender, sage, rose, coriander, fennel, anise, yarrow, geranium.

## СОДЕРЖАНИЕ

	с.
ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	10
ПРЕДИСЛОВИЕ .....	11
ГЛАВА 1. КУЛЬТУРА ИЗОЛИРОВАННЫХ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ И РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЙ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ГЕНОТИПОВ И МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ <i>IN VITRO</i> .....	14
1.1 Основные закономерности индукции морфогенеза в культуре изолированных органов и тканей растений.....	14
1.2 Использование соматональной изменчивости культивируемых клеток, мутагенеза <i>in vitro</i> и клеточной селекции для создания нового исходного селекционного материала.....	30
1.3 Некоторые аспекты клонального микроразмножения растений <i>in vitro</i> .....	47
1.4 Эфиромасличные растения как объект биотехнологических исследований .....	54
ГЛАВА 2. ЛАВАНДА УЗКОЛИСТНАЯ ( <i>LAVANDULA ANGUSTIFOLIA</i> MILL.).....	64
2.1 Особенности индукции и длительного субкультивирования каллуса и влияния различных факторов на эти процессы.....	65
2.2 Характеристика популяции каллусных клеток лаванды по цитопизиологическим параметрам и содержанию ДНК.....	71
2.3 Изучение биосинтетической способности изолированных культур лаванды.....	76
2.4 Индукция морфогенеза в каллусной культуре и определение основных лимитирующих факторов.....	79
2.5 Изучение влияния обработки колхицином на процессы каллусо- и морфогенеза.....	85
2.6 Методологические основы клеточной селекции лаванды на устойчивость к осмотическому стрессу.....	89
2.7 Разработка селективной системы на устойчивость к низкотемпературному стрессу у лаванды.....	96
2.8 Исследование морфогенеза в культуре меристем и оптимизация условий клонального микроразмножения <i>in vitro</i> ..	100
2.9 Характеристика регенерантов лаванды по морфологии и некоторым хозяйственно ценным признакам.....	106
ГЛАВА 3. КОРИАНДР ПОСЕВНОЙ ( <i>CORIANDRUM SATIVUM</i> L.).	111
3.1 Индукция каллусогенеза и анализ динамики цитопизиологических параметров в цикле выращивания популяции каллусных клеток.....	112

3.2 Особенности индукции соматического эмбриогенеза и развития проростков в каллусных культурах кориандра.....	117
3.3 Исследование влияния низкотемпературного стресса на развитие каллусов и зиготических зародышей и разработка селективной системы для получения устойчивых форм <i>in vitro</i> ....	123
3.4 Анализ растений-регенерантов кориандра, полученных из эмбрионных каллусных культур.....	129
ГЛАВА 4. ШАЛФЕЙ МУСКАТНЫЙ ( <i>SALVIA SCLAREA L.</i> ).....	133
4.1 Особенности индукции и длительного пассирования каллусных культур шалфея.....	134
4.2 Изучение закономерностей влияния различных факторов на морфогенез в каллусных культурах и оптимизация условий получения регенерантов.....	138
4.3 Характеристика регенерантов из каллусных культур по морфологии и некоторым хозяйственно ценным признакам.....	144
4.4 Разработка биотехнологических приемов селекции шалфея на устойчивость к осмотическому стрессу <i>in vitro</i> .....	149
4.5 Оптимизация условий клонального микроразмножения в культуре <i>in vitro</i> .....	156
ГЛАВА 5. РОЗА ЭФИРОМАСЛИЧНАЯ ( <i>ROSA SPP.</i> ).....	163
5.1 Получение и характеристика каллусных культур <i>in vitro</i> ....	164
5.2 Исследование накопления некоторых вторичных метаболитов в каллусных культурах.....	170
5.3 Использование культуры изолированных зародышей для получения гибридов розы эфиромасличной .....	175
5.4 Изучение некоторых вопросов микроразмножения <i>in vitro</i> ..	179
ГЛАВА 6. ГЕРАНЬ ЭФИРОМАСЛИЧНАЯ ( <i>PELARGONIUM SPP.</i> )..	188
6.1 Оптимизация режимов получения и характеристика каллуса.....	189
6.2 Изучение особенностей индукции прямого и непрямого морфогенеза в культуре <i>in vitro</i> .....	193
6.3 Исследование влияния обработки колхицином на процессы каллусо- и морфогенеза в каллусной культуре.....	199
6.4 Изучение действия NaCl на каллусо- и морфогенез <i>in vitro</i> и разработка режимов клеточной селекции.....	202
6.5 Оптимизация условий клонального микроразмножения герани эфиромасличной с использованием культуры меристем.....	207
6.6 Изучение полученных из каллусных культур регенерантов по морфологии, числу хромосом и хозяйственно ценным признакам.....	212
ГЛАВА 7. ФЕНХЕЛЬ ОБЫКНОВЕННЫЙ ( <i>FOENICULUM VULGARE MILL.</i> ).....	221

7.1 Оптимизация условий каллусогенеза и цитофизиологическая характеристика популяции каллусных клеток в цикле выращивания.....	222
7.2 Влияние различных факторов на индукцию соматического эмбриогенеза в каллусных культурах.....	225
7.3 Микроразмножение и получение растений-регенерантов фенхеля <i>in vitro</i> .....	234
ГЛАВА 8. АНИС ОБЫКНОВЕННЫЙ ( <i>ANISUM VULGARE GAERTN.</i> ).....	239
8.1 Получение и характеристика каллусной культуры аниса...	239
8.2 Индукция морфогенеза в культуре тканей и органов <i>in vitro</i> и регенерация растений.....	243
ГЛАВА 9. ТЫСЯЧЕЛИСТНИК ( <i>ACHILLEA SPP.</i> ).....	249
9.1 Получение и длительное пассирование каллусных культур некоторых видов тысячелистника.....	250
9.2 Индукция морфогенеза из эксплантов и каллусов <i>in vitro</i> ...	252
9.3 Клональное микроразмножение и анализ растений-регенерантов.....	256
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	261
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	273

## ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АБК	– абсцизовая кислота
Ад	– аденин
БАП	– 6-бензиламинопурин
б/г	– безгормональная питательная среда
ГК <sub>3</sub>	– гибберелловая кислота
2,4-Д	– 2,4-дихлорфеноксисукусная кислота
ИМК	– β-индолил-3-масляная кислота
ИУК	– β-индолил-3-уксусная кислота
к.г.	– гидролизат казеина
Кин	– кинетин
К.З.	– коэффициент засухоустойчивости
кол-во	– количество
К.Р.	– коэффициент размножения
МДЭМ	– массовая доля эфирного масла
МС	– питательная среда Мурасиге и Скуга [469]
НУК	– α-нафтилукусная кислота
ПРО	– пролин
ПЭГ	– полиэтиленгликоль
РИ	– ростовой индекс каллуса
2,4,5-Т	– 2,4,5-трихлорфеноксисукусная кислота
ТДЗ	– тидиазурон
ТИБК	– трийодобензойная кислота
ЧМП	– частота множественного побегообразования
Lim	– предел варьирования признака ( $x_{\min}$ - $x_{\max}$ )
V	– коэффициент вариации

## ПРЕДИСЛОВИЕ

К эфиромасличным относят растения, которые содержат эфирные масла, представляющие собой смесь различных химических соединений, в основном являющихся производными терпенов и сесквитерпенов. В эту группу технических культур входят однолетние и многолетние растения, среди которых есть деревья, кустарники, полукустарники, травы. Эфирные масла могут синтезироваться в разных органах – плодах, листьях, стеблях, цветках и соцветиях, корнях и корневищах. Чаще всего их накопление происходит в специализированных эфиромасличных экзогенных или эндогенных вместилищах (железках, волосках, канальцах). В мировой флоре насчитывается около 3000 растений, у которых выделены эфирные масла, однако промышленное значение имеет не более 200 [123, 164, 165]. Эти растения относятся к различным семействам (Яснотковым, Сельдерейным, Розоцветным, Гераниевым, Астровым и другим) и произрастают в разных экологических зонах. Уникальные природные условия юга России и Крыма, позволяют успешно выращивать здесь многие эфиромасличные виды – шалфей мускатный, лаванду узколистную и лавандин, кориандр посевной, фенхель обыкновенный, розу эфиромасличную, анис обыкновенный, Melissa лекарственную, виды мяты, полыни, душицы, котовника и других эфиромасличных и пряно-ароматических растений [151, 164]. Эти растения и продукты их переработки используются в парфюмерно-косметической, мыловаренной, пищевой, кондитерской, ликёро-водочной и фармацевтической промышленности. В медицине они применяются для лечения верхних дыхательных путей, опорно-двигательного аппарата, нервной системы, желудочно-кишечных, кожных и других заболеваний [434, 588]. Активное использование эфирных масел в медицине основано на их обезболивающих, противовоспалительных, противогрибковых, антибактериальных, антиоксидантных, тонизирующих и иммуномодулирующих свойствах [123, 151, 165, 209, 228, 276, 292, 346, 390, 477, 504]. Интерес к этой группе растений обусловлен увеличивающейся потребностью в натуральных продуктах и экологизации производств.

Биотехнологические методы в настоящее время широко используются в различных селекционных программах основных сельскохозяйственных растений, так как они позволяют существенно ускорить селекционный процесс, расширить генетическое разнообразие и создать новые формы и сорта. Традиционные методы селекции не всегда

позволяют получать необходимый исходный материал, особенно доноры устойчивости к стрессовым факторам среды. Огромные потенциальные возможности в создании и размножении селекционных форм с повышенной продуктивностью и устойчивостью открываются при использовании методов клеточной инженерии, таких как получение соматоклональных вариантов, мутагенез *in vitro*, клеточная селекция, клональное микроразмножение [26, 83, 94, 112, 134, 291, 420, 480, 517]. Убедительно показана их высокая эффективность в создании нового селекционного материала, используемого при выведении высокопродуктивных и экологически пластичных сортов многих хозяйственно ценных видов растений [16, 37, 47, 49, 90, 148, 179, 191, 224, 443, 463, 519]. Активно разрабатываются и используются последние 2-3 десятилетия биотехнологические приемы для микроразмножения и сохранения цветочно-декоративных, плодово-ягодных, технических, овощных и других культур [31, 44, 138, 140, 143, 174, 193, 211, 219].

Однако большинство этих клеточных технологий остается практически не разработанным для эфиромасличных растений, у которых в селекции преобладают традиционные методы отбора и гибридизации. Интенсификация селекционного процесса возможна в значительной степени с привлечением новых биотехнологий, которые могут помочь решить многие актуальные вопросы, связанные с получением высокомасличных, урожайных, а также устойчивых к абиотическим и биотическим стрессам форм. Не менее важны и методы клонального микроразмножения, позволяющие не только быстро размножить полученные *in vitro* растения и ценные образцы, но и ускорить их анализ и внедрение новых сортов в производство.

Для разработки теоретических и методологических основ биотехнологий создания генетически разнообразного селекционного материала и его размножения необходимо изучение закономерностей индукции каллусо- и морфогенеза и влияния различных факторов на эти процессы. Это обусловлено, прежде всего, отсутствием в литературе данных о таких клеточных технологиях у эфиромасличных растений, за исключением отдельных публикаций, посвященных изучению некоторых вопросов культивирования тканей и органов, регенерации растений, микроразмножения. По многим биотехнологическим направлениям нет единых подходов, а кроме того, существует высокая генетическая специфичность процессов морфогенеза в изолированной культуре, что обуславливает необходимость эмпирически подбирать

условия для регенерации *in vitro* и детально прорабатывать все этапы клеточных технологий для каждого вида или даже сорта растения. Вместе с тем, важно создание комплексных биотехнологий, которые включали бы не только разнообразные методы получения новых форм, но и приемы их ускоренного размножения, что практически не разработано для основных, выращиваемых в России, эфиромасличных растений. Исследования, направленные на изучение этих вопросов, весьма актуальны, так как способствуют не только углублению знаний о процессах каллусообразования и регенерации *in vitro*, но и позволяют создать на их основе биотехнологические системы, повышающие эффективность селекционного процесса эфиромасличных растений.

В первой главе монографии представлены общие сведения о методах клеточной инженерии, позволяющих создавать новые генотипы растений и размножать их в условиях *in vitro*. В следующих главах описаны биотехнологические исследования, проведенные в ФГБУН «НИИСХ Крыма» (ранее Институт эфиромасличных и лекарственных растений), с использованием эфиромасличных растений, преимущественно выращиваемых на юге России, таких как лаванда узколистная, кориандр посевной, шалфей мускатный, роза эфиромасличная, фенхель обыкновенный, анис обыкновенный, тысячелистник, герань эфиромасличная. Представлены данные об оптимизации условий индукции каллусо- и морфогенеза, регенерации растений *in vitro*, анализа соматоклональной вариабельности, а также о разработке приемов клеточной селекции, мутагенеза *in vitro*, клонального микроразмножения и получения веществ вторичного метаболизма в изолированных культурах.

Автор благодарен рецензентам – Харченко П.Н., академику РАН, РАСХН, доктору биол. наук, профессору, Митрофановой И.В., чл.-корр. РАН, доктору биол. наук и Мельничук Т.Н., доктору с.-х. наук за внимательный анализ работы и ценные замечания. Выражаю искреннюю признательность своим коллегам, сотрудникам ФГБУН «НИИСХ Крыма», за участие в проведении отдельных экспериментов – Ставцевой И.В., Бугаре А.М., Марченко М.П., а также за предоставленный растительный материал – Платоновой Т.В., Золотилову В.А., Меркурьеву А.П., Сильченко В.М. и другим. Особая благодарность директору ФГБУН «НИИСХ Крыма», доктору с.-х. наук Паштецкому В.С. за интерес к данной работе и содействие в написании и опубликовании книги.

# ГЛАВА 1

## КУЛЬТУРА ИЗОЛИРОВАННЫХ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ И РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЙ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ГЕНОТИПОВ И МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ *IN VITRO*

### 1.1 Основные закономерности индукции морфогенеза в культуре изолированных органов и тканей растений

Современные клеточные технологии создания генетического разнообразия у растений базируются на получении каллусных культур, разработке эффективных методов регенерации из них растений, а также изучении регенерантов для определения возможностей их использования в разных селекционных программах. Первый этап большинства биотехнологий – индукция каллуса в результате дедифференциации соматических клеток, при которой в результате действия условий изолированной культуры *in vitro* формируется особая клоновая популяция культивируемых соматических клеток. Каллусогенез достаточно хорошо изучен и описан во многих обзорах и статьях и не вызывает сложностей при работе с большинством видов растений [26, 97, 99, 108, 109, 112, 148, 420, 480, 517]. Исследование каллусной культуры важно не только в качестве модели при изучении цитодифференциации, физиологических и биохимических процессов, но и для определения возможностей ее практического использования, например, получения вторичных метаболитов, или для клеточных технологий в селекции [16, 49, 90, 153, 176, 179, 333, 336, 511]. Вместе с тем, особенности индукции и культивирования каллусов определяют цитогенетическую характеристику клеточной популяции и проявление соматической изменчивости у регенерантов, что было детально описано в работах ряда исследователей [16, 47, 112, 551].

Ключевым, и порой наиболее проблемным этапом многих клеточных и генноинженерных технологий является стабильная регенерация растений в культуре изолированных тканей, органов и клеток. Основой такой регенерации является индукция морфогенеза, которая представляет собой процесс формообразования, возникновения и развития специализированных клеток, тканей, органов и зародышей, сопровождающийся их дифференциацией. В результате морфогенеза в условиях *in vitro* реализуется уникальное свойство тотипотентности растительных клеток, которое может осуществляться двумя основными путями – путем органогенеза или соматического эмбриогенеза. При этом

морфогенез может осуществляться как прямым путем – непосредственно из тканей экспланта, так и непрямым – из каллусных или суспензионных культур. Процесс органогенеза, впервые описанный в 1939 г. Ф. Уайтом в каллусной ткани табака [цит. по 112], заключается в индукции монополярных структур и формировании *de novo* зачатков органов (почек, побегов, корней). Индукция органогенеза обычно происходит из группы клеток – меристематического очага или меристематического клеточного комплекса, например, как это было показано для пшеницы в работе О.А. Сельдимировой с соавторами [184]. Процесс этот многоэтапный – в случае геммогенеза вначале формируется почка, затем развивается побег, который при отсутствии ризогенеза в дальнейшем необходимо укоренять.

Соматический эмбриогенез представляет собой процесс развития зародышеподобных структур, напоминающий нормальный зиготический эмбриогенез. Впервые этот тип морфогенеза был описан для суспензионной культуры моркови F. Steward с соавторами в 1958 г. [цит. по 112], а позднее было показано, что развитие эмбриоидов в каллусной культуре происходило из индуцированных эмбриогенно детерминированных клеток [546]. Как правило, развитие эмбриоидов начинается из одной инициальной клетки [26, 109, 134], хотя есть данные и об их многоклеточном происхождении, например, у кукурузы [167], клевера [177], гречихи [42]. У некоторых видов растений (каладиума, киви, зизифуса, фейхоа, кориандра, ферулы, пассифлоры, каштана и других) был описан вторичный эмбриогенез, при котором на поверхности зародышей, находящихся на разных стадиях развития, формировались дополнительные эмбриоиды [138, 304, 373, 472, 476, 496, 503].

Процесс соматического эмбриогенеза состоит из ряда последовательных этапов, на которых вначале происходит индукция эмбриогенно компетентных клеток при высокой концентрации ауксина, а затем – развитие эмбриогенных клеток в эмбриоиды при его снижении или удалении из состава среды [112, 420, 517]. При развитии соматические зародыши последовательно проходят стадии, аналогичные зиготическим, после чего прорастают. Эмбриоиды представляют собой биполярные структуры, у которых развиваются апексы стебля и корня, поэтому полученные в результате соматического эмбриогенеза растения, как правило, имеют корни. Важным условием дифференциации таких зародышей является полярность. Р.Г. Бутенко указывала на то, что в массе преэмбриогенных клеток физиологическая ось полярности поддерживается

за счет активного базипетального транспорта эндогенного ауксина, а также градиентов биоэлектрических потенциалов и ионов кальция [26].

При соматическом эмбриогенезе, особенно непрямом, у многих видов растений часто возникают проблемы, среди которых можно назвать асинхронность развития эмбриоидов, появление аномальных зародышей или блокировку их дифференциации на какой-либо стадии. Например, развитие соматических зародышей у *Anacardium occidentale* доходило только до торпедовидной стадии [248], а у *Ferula assa-foetida* наряду с асинхронностью развития зародышей отмечали формирование аномальных эмбриоидов с тремя и более семядолями, причем прорастало лишь 40-50% зародышей [373]. В каллусе клематиса было выявлено 7 морфологических типов соматических эмбриоидов, из которых только четыре были способны к регенерации растений [138]. Серьезной проблемой, снижающей эффективность соматического эмбриогенеза, является низкая частота прорастания зародышей, хотя в ряде работ и указывалось на формирование из соматических эмбриоидов до 80-100% нормальных проростков [112, 490]. Тем не менее, у многих видов этот показатель довольно низкий – у картофеля, винограда, пробкового дуба, банана, вяза, каштана и ряда других видов прорастали и формировали нормальные растеньица от 5 до 56% зародышей [128, 138, 304, 337, 373, 461, 476, 507, 557]. Такая низкая частота прорастания зародышей может быть обусловлена генетической блокировкой их развития, наличием морфологических аномалий, различными потребностями для разных стадий, чувствительностью к обезвоживанию, а возможно, и другими причинами. Для стимуляции созревания и развития соматических зародышей в проростки используют ряд методических приемов, связанных с модификацией состава питательных сред и условий культивирования. У многих видов была показана эффективность снижения концентраций ауксинов, замены их на цитокинины, исключения гормонов из состава среды, а также добавления АБК, ПЭГ, ГК<sub>3</sub>, активированного угля, изменения концентраций сахарозы или консистенции питательной среды [112, 138, 313, 373, 428, 461, 476, 503, 602]. Так, у *Macrotyloma uniflorum* для созревания соматических зародышей их переносили на безгормональную жидкую среду, а затем для прорастания на твердую среду с ГК<sub>3</sub> и 1,5% сахарозы [461]. Индийские ученые для развития эмбриоидов применяли обработку АБК и высушивание с использованием силикагеля [557]. Положительный эффект на прорастание зародышей *Castanea sativa*, полученных из

листовых эксплантов, оказала холодовая обработка в течение двух месяцев при +4<sup>0</sup>С и культивирование на среде с 3% мальтозы [304].

Регенерация растений в культуре *in vitro* путем эмбриогенеза намного предпочтительнее органогенеза, благодаря отсутствию необходимости укоренения проростков, развитию растений из одной инициальной клетки, что очень важно для предотвращения миксплоидии и химерности регенерантов, а также более низкой вероятности формирования соматональных вариантов [112, 134, 546]. Поэтому этот тип морфогенеза, часто используется для клонального микроразмножения и при получении искусственных семян [138, 219, 420, 554]. В связи с этим представляет интерес выявление возможности направленного регулирования и индукции конкретного типа морфогенеза.

Во многих, особенно ранних работах, органогенез или соматический эмбриогенез чаще всего связывали с определенными видами растений. Классическим примером этого были каллусные культуры моркови и табака, у которых преимущественно формировались соответственно соматические зародыши и побеги [26]. Однако по мере накопления экспериментальных данных стало ясно, что у одного и того же вида растения могут наблюдаться оба типа морфогенеза [10, 112, 138, 215, 294, 380, 452, 510]. В некоторых исследованиях показано, что эти процессы индуцировались на одной питательной среде при одинаковых условиях. В частности, в каллусах из незрелых зародышей пшеницы одновременно наблюдались три типа развития: органогенез по типу гемморизогенеза, ризогенез и соматический эмбриогенез [10]. Параллельное формирование соматических зародышей и почек также было выявлено в каллусной культуре валерианы [294] и при прямом морфогенезе из эксплантов гипокотили гречихи [42]. Однако особый интерес представляют работы, в которых разные типы морфогенеза были получены при различных условиях, так как это позволяет исследователям регулировать направленность процессов регенерации растений. Чаще всего способность к соматическому эмбриогенезу или органогенезу определялась соотношением регуляторов роста в питательной среде. Так, у разных сортов люпина узколистного из незрелых зародышей стеблевой органогенез стимулировали при добавлении в среду МС 4 мг/л БАП и 0,1 мг/л НУК, а соматический эмбриогенез – 5 мг/л 2,4-Д и 0,25 мг/л Кин [215]. J. Mithila с сотрудниками из эксплантов листьев и черешков фиалки при

концентрациях ТДЗ ниже 2,5 мкМ наблюдали побеговый органогенез, а при более высоких дозах (5-10 мкМ) – соматический эмбриогенез [452]. В каллусной культуре из листовых эксплантов прострела чернеющего при наличии в среде БАП и НУК происходила индукция органогенеза, тогда как при использовании сред с ТДЗ и НУК развивались соматические зародыши [101]. В работе М. Parafotiou с соавторами также была показана зависимость морфогенного ответа от фитогормонов: из листовых эксплантов на среде с НУК формировались корни и клубни, с БАП – листья, а с 2,4-Д – зародыши [493].

Интересные результаты по регуляции направленности морфогенеза с помощью температуры культивирования были получены в исследованиях L. Decout с цикорием – из листовых эксплантов при +20 и 25°C развивался каллус и побеги, тогда как при +35°C происходила индукция прямого соматического эмбриогенеза, а при +30°C наблюдались все типы морфогенеза [310]. В работе корейских ученых было показано влияние на тип морфогенеза у *Catharanthus roseus* не только гормонов, но и типа экспланта. Так, из гипокотыля и семядоли на среде с НУК и БАП развивались побеги, из зиготических зародышей на среде с 7,5 мкМ ТДЗ – соматические зародыши, а с 2,5 мкМ ТДЗ или с НУК и БАП – побеги [314]. У земляники был выявлен совместный эффект фотопериода, темноты и холодной обработки на прямой соматический эмбриогенез из листовых высечек, в то же время такая обработка при +4°C ингибировала побегообразование [380]. В работе И.В. Митрофановой было показано, что у каладиума при культивировании эксплантов листьев без освещения происходило образование соматических зародышей, а на свету – органогенез в каллусе, не прямой и прямой соматического эмбриогенез. В культуре изолированных листьев фикуса регенерация растений также могла проходить двумя путями одновременно, при этом соматические зародыши формировались преимущественно по краю листовой пластинки, а прямое побегообразование чаще наблюдали в зоне вдоль основной жилки и у черешка [138].

Использование индуцированного морфогенеза в биотехнологической практике, а главное – управление этим процессом, может быть успешным при понимании механизмов его инициации и закономерностей проявления. Однако, несмотря на многочисленные исследования в этом направлении, к сожалению, пока многие вопросы остаются неясными, а подбор условий регенерации растений проводится эмпирическим путем. Процесс перестройки недифференцированных каллусных клеток в организованные

структуры сопровождается рядом молекулярно-генетических, физиолого-биохимических и морфологических изменений. Основным в индукции морфогенеза является активация генов, ответственных за проявление регенерационного потенциала. В настоящее время установлено, что этот признак контролируется сложной полигенной системой, включающей как ядерные, так и цитоплазматические гены [112]. Поэтому важным направлением исследований в выяснении закономерностей морфогенеза является выявление молекулярно-генетических механизмов и роли конкретных генетических систем и генов. Основные работы такого рода проведены для злаков. В обзоре Т.Н. Чеченовой была отмечена детерминированность реализации пути морфогенеза, которая определяется генетическими и физиологическими характеристиками растения, а также указывалось, что важнейшие культуральные признаки у пшеницы и других видов злаков контролируются различными генетическими системами и могут подвергаться направленному отбору [224]. У кукурузы образование эмбриогенного каллуса и его регенерационный потенциал были обусловлены аддитивными эффектами генов, однако у отдельных линий значительную роль играли эффекты доминирования, эпистаза и цитоплазматические факторы, в частности было отмечено участие в контроле регенерационной способности *in vitro* митохондриальных генов [112]. При изучении морфогенеза в каллусной культуре из незрелых зародышей ячменя К.В. Литовкин установил, что признак «регенерация растений» контролировался аддитивно-доминантной генетической системой с преобладанием эффектов сверхдоминирования, и отметил отсутствие влияния цитоплазмы и материнского эффекта на данный признак [119]. В качестве маркера ранних этапов соматического эмбриогенеза предлагалось использовать ген SERK, первоначально выявленный в клеточной суспензии моркови [цит. по 184]. В исследовании Н.В. Евсеевой с соавторами было показано, что содержание пролиферативного антигена инициалей (молекулярного маркера меристематических клеток злаков) в каллусах из зародышей пшеницы характеризовало процесс их перехода в стадию морфогенеза, что может быть использовано для оценки морфогенетической способности новых линий *in vitro* [52]. Н.К. Бишимбаева, изучая эмбриогенные каллусы пшеницы и ячменя, сделала заключение о том, что «апоптоз и секреция поли- и олигосахаридов играют ключевую роль в индукции и длительном поддержании тотипотентности в культуре ткани зерновых злаков» [278]. Перечисленные публикации свидетельствуют о

сложности и многообразии генетических механизмов контроля морфогенеза в культуре *in vitro*.

Хотелось бы также отметить обзор Ю.Н. Журавлева и А.М. Омелько, в котором процесс морфогенеза описан в терминах теории множеств на базе концепции биологических референтов, где организм задан как множество клеток, а процесс дифференциации – как создание классов эквивалентности в отношении общих признаков. Авторы указывали на непредсказуемость результатов морфогенеза *in vitro*, в основе которой часто лежит неопределенность числа и уровня компетенции клеток при его индукции, а также низкий уровень специфичности сигнала, индуцирующего регенерацию, в качестве которого чаще всего используются гормоны и стрессы [80].

Для выявления механизмов морфогенеза исследователи достаточно часто анализируют биохимические показатели каллусов с разной морфогенетической потенцией для определения компонентов, являющихся маркерами органогенеза или соматического эмбриогенеза. Имеются данные о том, что индукция морфогенеза *in vitro* у пшеницы, кукурузы, ячменя, табака, винограда, гречихи связана с изменением в синтезе мРНК, белков, а также с активностью ферментов [33, 52, 154, 175, 442]. В работе О.В. Дубровной было показано, что в морфогенном каллусе кормовой свеклы содержалось в 2,7 раз больше РНК, чем в неморфогенном, что свидетельствует о большей функциональной активности генома составляющих его клеток [49]. У гречихи в каллусе с проэмбрионными клеточными комплексами содержалось в 6-7 раз больше белков, чем в недифференцированном, при этом в морфогенном каллусе преобладали низкомолекулярные полипептиды [33]. При изучении морфогенных каллусов пшеницы также было выявлено повышенное количество белка, и был выделен ряд изоферментов глутаматдегидрогеназы, пероксидазы и нитратредуктазы, которые могут являться маркерами морфогенеза [154]. В.Н. Решетников с сотрудниками установили корреляцию между морфогенной и ферментативной активностью длительно культивируемых каллусных тканей табака и показали, что процессы морфогенеза сопровождалась инициацией экспрессии специфических пероксидаз [175]. При анализе электрофореграмм различных фракций белков в культуре *in vitro* у *Dendrobium* было выявлено 12 полипептидов фракции легкорастворимых белков и три полипептида из фракции белков клеточных стенок, которые автор предлагал использовать в качестве потенциальных маркеров

адвентивного побегообразования [103]. Показано, что маркерами морфогенеза у кукурузы могут быть изоформы глутаматдегидрогеназы и пероксидазы, а у риса, ячменя и гороха – некоторые электрофоретические компоненты легкорастворимых белков. В морфогенном каллусе мягких и твердых сортов пшеницы обнаружили более высокое содержание лектина, по сравнению с неморфогенным (от 3-х до 66-ти раз), однако не было установлено некоего общего количественного порога лектина, превышение которого способствовало бы индукции морфогенеза [227]. При изучении прямого морфогенеза из эксплантов листьев камелии, а также эмбриогенеза в каллусе апельсина [601] показана связь синтеза эндогенных полиаминов (путресцина, спермидина и спермина) с соматическим эмбриогенезом [499].

Важную, а порой решающую роль, в индукции морфогенеза играет баланс и уровень эндогенных фитогормонов как исходного экспланта, так и каллусной ткани [26, 86, 107, 112, 185, 186, 210, 392]. Ю.И. Долгих отмечала, что способность каллусов кукурузы к регенерации растений детерминирована зависящим от генотипа балансом эндогенных гормонов и может варьировать под воздействием внешних регуляторов [47]. При определении содержания различных регуляторов роста в каллусе винограда было установлено, что его эмбриогенная способность коррелировала с высоким содержанием АБК, а также с сезонным повышением ИУК и АБК [392]. Определение эндогенных гормонов в эмбриогенном каллусе лиственницы и кедра показало, что в них происходило возрастание уровня цитокининов и АБК, по сравнению с эксплантами [210]. Для каллусных культур пшеницы и ячменя было показано, что способность к индукции соматического эмбриогенеза определялась балансом содержания в них ИУК и АБК. При этом содержание цитокининов в эмбриогенных и неэмбриогенных типах каллусов было примерно одинаково [186].

Процессы органогенеза и соматического эмбриогенеза достаточно подробно описаны для изолированных культур пшеницы, риса, ячменя, кукурузы и других злаков [37, 47, 90, 166, 224], декоративных и садовых растений [83, 138], томатов [148], тропических и субтропических культур [219], лекарственных и пряно-ароматических растений [64, 476, 491, 581] и других видов. Во многих работах показано, что на морфогенез и регенерацию растений оказывали влияние эндогенные и экзогенные факторы – генотип, возраст и условия выращивания растения, время года, когда проводилось введение в культуру, тип экспланта и его

расположение на растении, состав питательной среды, ее консистенция и рН, длительность пассирования каллуса, условия культивирования *in vitro*, стрессовые факторы. Конечно, невозможно в рамках данного обзора подробно рассмотреть все эти факторы, поэтому ограничимся несколькими наиболее интересными, на наш взгляд, данными, прежде всего, касающимися непрямого морфогенеза.

В настоящее время не вызывает сомнений генетическая обусловленность многих процессов *in vitro*, в частности каллусогенеза, морфогенеза и регенерации растений. Это подтверждается многочисленными литературными данными о влиянии семейства, вида, сорта, линии, а иногда и индивидуального растения на частоту органогенеза или соматического эмбриогенеза в каллусных культурах. Р.Г. Бутенко расположила некоторые семейства по степени снижения их способности к органогенезу от пасленовых к зерновым злакам [26]. Отмечена значительная варибельность индукции соматического эмбриогенеза в каллусных культурах из семяпочек у сортов винограда [602], сортовые различия пшеницы по способности к регенерации побегов в каллусе из незрелых зародышей [10], а также варибельность по частоте регенерации в каллусах из незрелых зародышей у линий ярового ячменя [119]. В исследованиях Т.В. Чугунковой с соавторами было выявлено, что регенерационная способность каллусных культур кормовой свеклы была в 2-3 раза ниже, чем у сахарной, в частности, максимальная частота регенерации побегов у разных генотипов кормовой свеклы не превышала 40%, а у сахарной свеклы этот показатель для некоторых генотипов достигал 90% [225]. Установлено, что у генотипов дикого томата способность к каллусо- и органогенезу была выше, чем у генотипов культурного [148]. Значительное варьирование регенерационного потенциала в каллусных культурах из соматических тканей у разных генотипов мягкой и твердой пшеницы и люцерны была показана в исследованиях С.А. Игнатовой [90]. При изучении различных линий кукурузы Г.Р. Пиралов и О.Е. Абраимова установили, что частота индукции морфогенных каллусов из незрелых зародышей колебалась от 0,4 до 90,6% [166]. Для каллусных культур клевера была показана внутрисортная изменчивость по их регенерационной способности [277]. Э.И. Давоян при сравнении морфогенетических потенциалов каллусов из зародышей 22 генотипов риса отметил их значительные различия и выделил три группы: с высокими регенерационными способностями каллуса (до 60% и выше), со

средними способностями (до 30%) и неспособные к регенерации [43]. В этой работе была показана возможность передачи при скрещивании признаков высокой каллусогенной и регенерационной способности потомству и констатировалось, что от выбора соответствующего генотипа в значительной степени зависит успех применения метода культуры тканей в селекции. Вместе с тем, необходимо отметить, что имеются единичные данные об отсутствии влияния генотипа на морфогенез в изолированной культуре, например, у тмина [326] и различных сортов озимого и ярового рапса [204].

Важнейшим фактором в индукции морфогенеза, на который акцентируют внимание большинство исследователей, является питательная среда. Существует много данных о составах сред, необходимых для регенерации растений в культуре каллусных тканей и органов у основных сельскохозяйственных и дикорастущих видов, и тем не менее, для каждого нового генотипа часто приходится оптимизировать индукционные среды, что обусловлено определяющей ролью взаимодействия факторов генотип – состав среды в процессе морфогенеза *in vitro* [26, 112]. Например, у разных видов семейства *Restionaceae* соматический эмбриогенез из колеоптилей стимулировался разными гормонами – у *Desmocladus flexuosus* необходимо введение в среду БАП и ТДЗ, а у *Baloskion tetraphyllum* 2,4-Д [490]. Для индукции морфогенеза в каллусных тканях различных генотипов ячменя С.А. Игнатовой были разработаны разные модификации питательных сред [90]. Следует подчеркнуть очень большое разнообразие представленных в литературе составов питательных сред для морфогенеза, варьирующих не только в зависимости от вида растения, но и типа экспланта, условий культивирования и других факторов. Например, у тмина из эксплантов зародыша максимальная регенерация побегов происходила на среде с 0,1 мг/л НУК и 1 мг/л ИУК, тогда как для узловых эксплантов лучший результат показало сочетание 0,1 мг/л БАП и 1 мг/л НУК [326].

Для успешной индукции морфогенеза необходимы различные компоненты питательной среды: макро- и микроэлементы, источники углерода, витамины, восстановленный азот и гормоны. Определяющую роль во вторичной дифференциации в культуре тканей играют регуляторы роста. Регенерация растений путем органогенеза или соматического эмбриогенеза обычно представляет собой многоэтапный процесс и на каждом этапе порой необходимы различные типы и

концентрации гормонов. Исследованиями F. Skoog и C.O. Miller была впервые показана важная роль соотношения ауксина и цитокинина в формировании органов в культуре тканей у табака: высокое соотношение стимулировало ризогенез, низкое – геммогенез, а промежуточные – каллусогенез [цит. по 26]. В дальнейшем было установлено, что данная закономерность не всегда проявлялась у других растений, у которых были выявлены значительные различия по гормональной регуляции морфогенеза в культуре тканей и органов. Тем не менее, у большинства видов указывается на важную роль в индукции побегов цитокининов, которые вводятся в питательную среду самостоятельно или в сочетании с более низкими концентрациями ауксинов [26, 112, 420, 480, 517, 581]. Для формирования побегов эффективно снижение концентраций гормонов и солей, дополнение среды ГК<sub>3</sub>. Например, у примулы для регенерации почек из каллуса листового происхождения использовали среду с 30 мкМ БАП, 0,1 мкМ НУК и 10 мкМ ГК<sub>3</sub>, а для роста побегов – с 10 мкМ БАП, 0,5 мкМ НУК, 5 мкМ ГК<sub>3</sub> [19]. В каллусе табака индукция побегов проходила на среде с 2 мг/л БАП и 0,1 мг/л ИУК [175], у мягкой пшеницы – с 1 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИУК [10], у сахарного тростника – с 2 мг/л Кин и 1,3 мг/л ИУК [575], у рапса – с 2-8 мг/л БАП, 1-2 мг/л НУК и 1 мг/л АБК [171], у *Schizanthus hookeri* – с 0,5 мг/л НУК и БАП [395]. В то же время у тмина максимальную частоту регенерации побегов из эксплантов зародыша наблюдали на среде с одними ауксинами НУК и ИУК [326]. О.В. Дубровная с соавторами также показала эффективность использования ауксина – у каллусов пшеницы на среде с пиклорамом повышалась частота регенерации побегов [49].

Гормональный состав питательных сред для индукции непрямого соматического эмбриогенеза, значительно варьировал у разных видов растений, хотя в большинстве работ отмечали важную роль в этом процессе 2,4-Д [83, 90, 112, 166, 382, 476, 503]. Помимо этого ауксина также использовали НУК, пиклорам, дикамбу, а также цитокинины БАП, Кин, ТДЗ, зеатин [101, 138, 313, 407, 420, 461, 490, 493, 557]. Чаще всего применялось комплексное воздействие разных регуляторов роста, например, у винограда [602] или акации [581]. В ряде исследований отмечено положительное влияние на соматический эмбриогенез АБК, которая способствовала «созреванию» зародышей [138, 210, 557, 563]. И.Ф. Шахметов показал, что культивирование каллуса пшеницы на фоне АБК стимулировало морфогенез, что могло быть связано с участием этой кислоты в регулировании уровня эндогенных

фитогормонов (в частности, ингибированием синтеза ИУК), стимуляции синтеза некоторых ферментов и пролина [227].

Следует отметить, что в литературе имеются сведения об индукции морфогенеза на безгормональных средах, например, в каллусных культурах кормовой свеклы [225], ячменя [611], а также прямой и непрямой соматический эмбриогенез у *Ferula assa-foetida* [373], *Citrus sinensis* и *Plex aquifolium* [138]. По-видимому, возможность такой регенерации обусловлена достаточным уровнем эндогенных фитогормонов в тканях этих видов растений.

Наряду с регуляторами роста, у многих видов растений было показано стимулирование процессов органогенеза или соматического эмбриогенеза при введении в среду различных источников восстановленного азота (аминокислот, пептона, казеинового гидролизата, кокосового молока), активированного угля, AgNO<sub>3</sub>, осмотиков (ПЭГ, маннита), антимикротрубочковых соединений, высоких концентраций сахарозы, глюкозы или мальтозы [83, 90, 112, 138, 174, 210, 313, 420, 465, 503, 564, 575]. Так, у кукурузы добавление БАП и AgNO<sub>3</sub> в регенерационную среду у каллусов, полученных на среде с маннитом, позволило преодолеть низкую регенерационную способность ценных инбредных линий [221]. При изучении каллусных культур люцерны показано, что сахароза, взаимодействуя с фитогормонами, маннитом и NaCl, участвовала в регуляции процессов дифференцировки, причем на стадии каллусогенеза и регенерации растений она в основном выступала в качестве осмопротектора, а на стадии эмбриогенеза – в качестве источника энергии [5]. У сахарного тростника для индукции прямого соматического эмбриогенеза из незрелых соцветий использовали добавление в питательную среду глутамина [313], а для стимуляции непрямого соматического эмбриогенеза – пролина и кокосового молока [564]. S.V. Mohamed с соавторами сообщали о положительном действии глутамина, аланина, пролина на соматический эмбриогенез у соевых бобов, зеленого горошка и моркови [461]. В работе индийских ученых формирование соматических зародышей в каллусе из зародышей риса стимулировалось при введении в среду 3,78 мкМ АБК, 1 г/л гидролизата казеина и 164,8 мМ маннита [563]. Добавление ГК<sub>3</sub> и АБК к питательной среде с Кин способствовало повышению частоты индукции соматического эмбриогенеза с 69 до 98% в каллусе у *Tylophora indica* [574].

Следует обратить внимание на тот факт, что у многих видов в процессе регенерации растений *in vitro* требуется изменение состава

питательной среды, что связано с различной потребностью тканей и органов на разных этапах их дифференциации. Наиболее сложен в этом плане непрямой соматический эмбриогенез. Традиционно, на этапе индукции в среду вводят 2,4-Д, затем по мере развития зародышей необходимо добавление цитокининов, ГК, а для их дозревания и прорастания из среды исключают эти фитогормоны, или иногда используют АБК, активированный уголь, жидкую питательную среду и другие приемы [420, 480, 517]. И.В. Митрофанова указывала, что для формирования растений из эмбрионного каллуса зизифуса необходима последовательная смена трех сред, у фейхоа – двух, а у какао – девяти [138]. У голубинового гороха при получении растений путем соматического эмбриогенеза из семядолей D.V. Patel с соавторами использовали 3 среды: в первой присутствовали БАП, Кин и аденин, во второй концентрации этих гормонов снижали в 10 раз, а в третью добавляли ИМК и ГК<sub>3</sub> [496]. Показано, что у лиственницы и кедра для каждого этапа соматического эмбриогенеза необходимы разные составы питательных сред. Индукция эмбрионного каллуса из зародышей проходила под действием БАП и 2,4-Д, затем его последовательно переносили на среды с пониженным содержанием цитокининов и сахарозы для пролиферации эмбрионально-суспензорной массы, и с добавлением АБК и ИМК для созревания зародышей. Прорастание зародышей инициировали на безгормональной среде с активированным углем [210].

Одним из важных факторов, лимитирующих морфогенез *in vitro*, является тип экспланта, при этом необходимо учитывать его физиологическое состояние, которое зависит от исходного органа, его возраста, размера и расположения на растении, времени года, когда он был введен в культуру *in vitro* [26, 112, 134]. Имеющиеся литературные данные свидетельствуют о том, что для индукции прямого или непрямого морфогенеза могут быть использованы различные части растения – сегменты стеблей, листьев, черешков, корней, соцветий, цветков, луковиц, а также вегетативные и генеративные почки, пыльники, семечки, зародыши, органы проростков. У злаков (пшеницы, ячменя, риса, кукурузы) для введения в культуру чаще всего использовали незрелые, или, реже, зрелые зародыши [37, 90, 119, 184, 227, 284, 312, 563]. У многих видов плодовых, ягодных, овощных, декоративных и лекарственных культур в качестве эксплантов применяли сегменты листьев или стеблей зрелых растений [29, 64, 138, 148, 174, 304, 410, 465,

476, 562, 585]. При эксплантации на питательные среды лучше использовать более молодые органы или растения, которые обладают лучшей пролиферативной и морфогенетической активностью. Поэтому в последние годы у многих видов растений в асептическую культуру вводят части проростков, развившихся из семян *in vitro*. Такой подход был использован у мягкой и твердой пшеницы [10, 49, 227], кукурузы [203], гречихи [42], кормовой свеклы [225], рапса [171], сахарного тростника [575], тмина [326], примулы [19], ферулы [373], буниума [591], балоскиона [490], а также у ряда цветочно-декоративных, лекарственных, эфиромасличных и других растений [64, 83, 138, 298, 338, 372, 448].

Для каждого вида растения, как правило, эмпирически подбирают оптимальные, более «отзывчивые» типы эксплантов, способные к высокой частоте каллусообразования и морфогенеза. Например, в работе А.В. Бавол с соавторами было показано, что незрелые зародыши мягкой пшеницы имели более высокую частоту регенерации по сравнению с листовыми сегментами из проростков [10], а у томатов при сравнении стеблевых сегментов, мезофилла и черешка листа было установлено, что самой низкой регенерационной способностью обладал стебель [148]. От типа используемого экспланта зависит не только частота морфогенеза, но часто и необходимость в разных питательных средах. Для *Aeschynanthus radicans* было показано, что индукция соматического эмбриогенеза из стеблевых сегментов с максимальной частотой 71% проходила на среде МС с 2,68 мкМ 2,4-Д и 9,08 мкМ ТДЗ, а из листовых – с частотой 40% при снижении концентрации ТДЗ до 6,81 мкМ [306]. У тмина прямое побегообразование из эксплантов зародышей лучше проходило на среде с НУК и ИУК, а из сегментов стебля – с НУК и БАП [326]. В.Н. Решетников с сотрудниками показали влияние типа экспланта на длительность сохранения морфогенного потенциала у табака – у каллусов из листа в 27-м пассаже отмечали регенерацию побегов с частотой до 38,1%, тогда как каллусные культуры стеблевого происхождения не проявили морфогенной реакции [175].

В ряде исследований указывалось на важную роль возраста экспланта и его расположения на растении [203, 225, 493, 530, 575]. Например, у *Brassica napus* максимальную способность к побегообразованию проявили экспланты семядолей 3-дневных проростков, а на эксплантах 7-дневных проростков побеги не образовывались [171]. У *Baloskion tetraphyllum* молодые колеоптилы из 5-7 дневных растений продуцировали в 168 раз больше соматических

зародышей, чем из 14-дневных [490]. У сахарного тростника максимальный процент каллусогенеза и побегообразования был получен при использовании первых двух базальных сегментов стебля растений, тогда как из 3-5-го сегментов регенерации не наблюдали [575]. И.В. Митрофанова установила, что у каладиума соматический эмбриогенез преимущественно наблюдался в зоне соединения листовой пластинки с черешком и по краю высежки листа, у фикуса по краю листовой пластинки происходила индукция соматических эмбриоидов, а в зоне вдоль жилки листа – побеговый органогенез [138]. Такая вариабельность морфогенетических реакций разных эксплантов может быть обусловлена разнообразием составляющих их тканей, полярностью вычлененного сегмента, уровня и градиента эндогенных гормонов, нахождения клеток на разных фазах митотического цикла.

Хотелось бы обратить внимание еще на один фактор, не только существенно влияющий на морфогенез, но и на возможность разработки многих клеточных технологий, – это длительность культивирования каллусов. У большинства видов растений способность каллусов к органогенезу или соматическому эмбриогенезу часто ограничена первыми пассажами и с увеличением возраста культуры снижается вплоть до полной потери [26, 94, 112, 134, 420]. Например, у некоторых линий кукурузы регенерация в каллусной культуре из незрелых зародышей наблюдалась только два месяца [221], у лука показано образование почек в каллусной ткани из завязей на протяжении 4 пассажей [28], а для некоторых генотипов ячменя регенерация в каллусе из зародышей наблюдалась 4-5 пассажей [93]. В работе А. Ziauddin и К. J. Kasha была выявлена полная утрата морфогенного потенциала полученных из зародышей каллусов ячменя через 7 месяцев их культивирования [611]. Снижение в поздних пассажах морфогенного потенциала может быть связано с изменением уровня эндогенных гормонов, накоплением негативных генетических изменений в соматических клетках, их полиплоидизацией, метилированием ДНК, а возможно, и другими, пока не установленными причинами. Такая непродолжительная регенерация *in vitro* значительно осложняет разработку многих биотехнологий создания новых генотипов, в частности, клеточной селекции. Поэтому для преодоления этих сложностей исследователи подбирают более «отзывчивые» генотипы и экспланты, модифицируют условия культивирования, а чаще – оптимизируют составы регенерационных сред. При изучении каллусных

культур пшеницы, полученных из листовых эксплантов и верхушек проростков, О.В. Дубровная с соавторами установили, что на среде с 2,4-Д морфогенная способность проявлялась в течение 4 пассажей, а при введении в состав среды пиклорама регенерационная способность сохранялась до 5-6-го пассажей [49]. У кукурузы введение в питательную среду  $AgNO_3$  и маннита способствовало продлению морфогенной способности каллусов с двух до 5-6 месяцев [221]. Г.В. Соболева показала, что у гороха морфогенез в длительно пассируемом каллусе поддерживался за счет чередования каждые 3-4 пассажа сред с низким содержанием НУК (0,2 мг/л) и с более высоким ее содержанием (2,0 мг/л) при неизменной концентрации БАП [195]. Для каллусов ириса, полученных из зародышей, было установлено, что последовательное изменение состава сред позволило поддерживать способность к соматическому эмбриогенезу и органогенезу в течение трех лет [510].

Вместе с тем, в ряде работ было показано, что при оптимизации различных условий культивирования способность к морфогенезу в каллусных культурах могла сохраняться достаточно длительный период, часто при этом происходило снижение его частоты. Так, у *Gentiana pneumonanthe* в каллусе, полученном из эксплантов корней, с 9-го по 19-й пассаж выявили снижение частоты индукции побегов с 17,4 до 9,1%, а у двух других видов горечавок, уже с 13-го пассажа органогенез не наблюдался [202]. В работе Т.В. Чугунковой с соавторами, наоборот, было показано, что у кормовой свеклы частота формирования побегов в каллусе из эксплантов черешков с листом с 3-го по 12-й пассаж увеличилась до 40% [225]. Имеются данные о сохранении в течение двух лет эмбриогенного потенциала в каллусных культурах у некоторых линий кукурузы [166], в каллусе из семяночек у винограда [602]. В суспензионной культуре *Angelica sinensis* эмбриогенная способность сохранялась в течение 10 лет [476], в каллусе гороха 10-15 лет [8], а в каллусе из гипокотыля *Cucurbita pepo* – до 15 лет [397]. В.Н. Решетников с сотрудниками показали, что в культивируемом в течение трех лет каллусе табака происходило снижение частоты побегообразования, при этом каллус 58-го пассажа проявил морфогенную реакцию лишь после трех пересадок на индукционную среду. Такая замедленная реакция, по мнению авторов, была обусловлена насыщением тканей ауксинами, способствующими, прежде всего, активной пролиферации каллуса при длительном пассировании на среде для каллусообразования [175].

Представленные данные о влиянии некоторых факторов на морфогенез культивируемых тканей лишь в малой степени отражают все разнообразие процессов дифференциации *in vitro* у разных видов растений, но, тем не менее, однозначно свидетельствуют о недостаточности наших знаний об их закономерностях. Значительная генотипическая зависимость регенерационного потенциала осложняет разработку биотехнологий, так как действие тех или иных факторов, выявленных у одного вида, не всегда проявляется у других. Это вынуждает исследователей оптимизировать условия индукции органогенеза и соматического эмбриогенеза для других генотипов или иных задач работы.

## **1.2 Использование соматклональной изменчивости культивируемых клеток, мутагенеза *in vitro* и клеточной селекции для создания нового исходного селекционного материала**

Получение растений из изолированных культур *in vitro* является итогом многих клеточных технологий, используемых в растениеводстве. И от их характеристики в значительной степени зависит направленность дальнейшей работы, так как для одних целей (например, клонального размножения) требуется генетическая стабильность, а для других, наоборот, желательна изменчивость регенерантов (при создании исходного селекционного материала). И если в ранних работах получение растений в культуре тканей и органов рассматривалось чаще как способ размножения, то, начиная с 60-70-х годов прошлого столетия, накоплен обширный литературный материал, свидетельствующий о появлении изменчивости, как у культивируемых клеток, так и среди полученных из них растений [16, 112, 134, 191, 420, 480]. Одними из первых исследований, свидетельствующих о получении измененных растений в культуре тканей, были работы, проведенные в лаборатории Р.Г. Бутенко. В них было показано, что среди регенерантов из каллусов табака сорта Трапезонд 80% были морфологически измененными и 14% стерильными [26]. В дальнейшем у других видов растений было показано, что процесс неорганизованного роста клеток и тканей в культуре *in vitro* способствует возникновению особого вида изменчивости – соматклональной вариабельности, которая может приводить к появлению растений, отличающихся от исходных форм по фенотипическим и генетическим признакам. В 1981 году австралийские ученые P.J. Larkin и W.R. Scowcroft в своей статье о соматклональной

изменчивости, как источнике генетического разнообразия в создании новых форм растений, предложили для таких растений термин «сомаклоны». Они определяли соматоклональную изменчивость как наследуемую изменчивость, наблюдаемую у культивируемых *in vitro* клеток, а также у растений, регенерировавших из каллусов, клеток или эксплантов [429]. Помимо соматоклональной выделяют еще гаметоклональную изменчивость у регенерантов, полученных из пыльников и семян [90, 94, 420, 517, 519].

Следует обратить внимание, что в изолированной культуре могут возникнуть также и эпигенетические вариации, которые отличаются от мутаций и соматоклональных вариаций тем, что не сохраняются в цикле клетка – растение – клетка [26]. Поскольку эпигенетические изменения не наследуются в потомстве регенерантов, то они не представляют интереса для селекции в качестве исходного материала. Поэтому для определения характера изменчивости и подтверждения ее генетической природы, как правило, анализируют семенное потомство регенерантов в течение 2-3-х поколений у видов с половым размножением [90, 179, 191, 224] а для вегетативно размножаемых видов – в течение как минимум двух циклов клонального размножения [174, 192, 217].

К основным причинам возникновения соматоклональной вариабельности в культуре изолированных клеток и тканей относят естественное генетическое разнообразие клеток растений *in situ*, а также изменчивость генотипа в процессе культивирования *in vitro* [99, 134, 191, 519]. Первая причина обусловлена тем, что в меристемных тканях у 80% покрытосеменных на различных этапах онтогенеза могут наблюдаться хромосомные изменения, образование клеток разного уровня ploидности, поэтому наряду с диплоидными в тканях могут с небольшой частотой встречаться анеуплоидные, полиплоидные и мутантные клетки с изменениями структуры хромосом [112]. Чаще всего химеризм и миксоплоидия встречаются у вегетативно или апомиктично размножаемых видов, а также при изменении условий произрастания растений.

Важнейшей причиной соматоклональной вариабельности являются также возникающие *de novo* генетические изменения культивируемых соматических клеток [94, 99, 134, 192, 226, 517, 519]. Такую нестабильность генома могут вызывать: потеря организменного контроля, механическое повреждение при выделении экспланта, отличающиеся от растения условия существования клеток *in vitro*, мутагенное действие

компонентов питательной среды, а также, возможно и другие, пока неизвестные факторы. В процессе дедифференциации эксплантов и каллусогенеза возникает особая неполовая популяция соматических клеток, которой свойственны высокий уровень генетической, и как следствие, морфологической, физиологической и биохимической гетерогенности клеток, асинхронность развития, популяционный и экзогенный контроль, появление гетеротрофного способа питания и некоторые другие признаки, отличные от клеток растений *in vivo* [26]. В монографии В.А. Кунаха представлен детальный анализ собственных и литературных данных, свидетельствующих о значительной изменчивости числа и морфологии хромосом, а также о структурных перестройках хромосом и ДНК в процессе формирования и функционирования клеточных популяций *in vitro* у многих видов растений [112]. Соматональные изменения затрагивают не только ядерный, но и митохондриальный и пластидный геномы. В работах, посвященных соматональной изменчивости, к основным механизмам ее возникновения относят: грубые кариологические изменения, касающиеся изменения количества и морфологии хромосом; небольшие перестройки хромосом; транспозиции подвижных генетических элементов; изменения в метилировании последовательностей ДНК; амплификацию и редукцию повторяющихся последовательностей ДНК; соматический кроссинговер и обмен сестринских хроматид; криптическую элиминацию вирусов [94, 192, 429, 519].

Цитогенетическая гетерогенность культивируемых клеток пшеницы часто сопоставима или превышала изменчивость, индуцируемую химическими или физическими мутагенами [17]. Установлено, что частота точковых мутаций у соматоклонов риса, пшеницы, кукурузы, гороха достигала и даже превышала частоту возникновения мутаций при ионизирующем облучении, а изучение варибельности каллусных клеток раувольфии в длительно культивируемых штаммах показало, что изменение геномного материала превышало межвидовые отличия [112]. По-видимому, значительный уровень генетической изменчивости, характерный для популяций соматических клеток, появление миксоплоидии и полиплоидии являются одним из механизмов их адаптации к условиям существования *in vitro*.

Однако такая высокая гетерогенность культивируемых клеток не обязательно реализуется в регенерантах, и спектр их изменчивости обычно гораздо меньше. Это связано с усилением действия

стабилизирующего отбора в клеточных популяциях при вторичной дифференциации и индукции морфогенеза. В результате чего способность к формированию соматических эмбриоидов и меристематических клеточных комплексов проявляют в основном диплоидные клетки без значительных хромосомных перестроек, что, в частности, было показано для гаплоаппуса, скереды, гороха и других видов [112]. Более высокая морфогенетическая способность штаммов табака с меньшими цитогенетическими повреждениями, по мнению З.Б. Шаминой, была обусловлена тем, что «для развертывания морфогенетической программы требуется определенная сбалансированность генетического аппарата» [226]. В работе С.А. Бабаевой с соавторами в морфогенном каллусе твердой пшеницы были обнаружены различные цитогенетические аномалии (полиплоидные и анеуплоидные клетки, изменения структуры хромосом), число которых повышалось по мере пассирования. Количество полиплоидных или анеуплоидных клеток у некоторых каллусных линий достигало 40-67%, однако их реализация в регенеранты наблюдалась с частотой 1,7%. По мнению авторов, основной причиной соматической изменчивости у пшеницы были точковые мутации [9]. Следует отметить, что у некоторых видов отмечали отсутствие изменений у полученных из каллусов растений [192, 299, 408].

Большое число исследований посвящено анализу полученных *in vitro* регенерантов, при этом во многих случаях был выявлен значительный спектр измененных по сравнению с исходными формами признаков, которые наследовались в поколениях. Для многих видов растений были установлены отличия растений, полученных из каллусов, клеточных суспензий, протопластов, по морфологии и биохимическим показателям, числу хромосом, хозяйственно полезным признакам, устойчивости к болезням и абиотическим стрессам [40, 47, 113, 134, 174, 179, 191, 345, 480, 517, 519]. В обзоре С.А. Игнатовой приведены многочисленные данные по соматической изменчивости у основных сельскохозяйственных культур (пшеницы, ячменя, риса, сахарного тростника, картофеля, и других) и отмечена широкая вариабельность многих хозяйственных признаков, которые могли изменяться как в положительную, так и отрицательную сторону [90]. Т.Н. Чеченева, анализируя работы по изменчивости регенерантов у кукурузы, указывала на то, что максимальное количество наследственных изменений было у регенерантов R<sub>2</sub>, когда, наряду с доминантными, проявлялись и

рецессивные признаки. Многие регенеранты имели не менее одного измененного признака. При этом большинство из полученных соматклонов были аллельны известным мутантам, но было возможным получение и новых, ранее не описанных мутаций [224]. Ю.И. Долгих при изучении регенерантов из каллусных культур кукурузы выявила высокую частоту вариаций признаков, при этом разнообразие среди регенерантов превышало пределы изменчивости исходных контрольных растений преимущественно за счет нижней границы значения показателей признаков [47]. Среди регенерантов риса, полученных Л.А. Кучеренко с сотрудниками, чаще всего встречались мутации стерильности, высоты растений, остистости, окраски цветочных чешуй, а также были выделены формы, отличающиеся от исходных сортов по важнейшим хозяйственно ценным признакам (продуктивности, качеству зерна, длине вегетационного периода). Выявлены регенеранты с очень редкими для риса признаками (антоциановая окраска листьев, «сорговидная» форма метелки), а также с признаками, которые ранее не встречались (необычная окраска цветковых чешуй и веточек метелки) [113]. Сравнивая у томатов вариабельность, индуцированную в культуре тканей и мутагеном этилметансульфонатом при обработке семян и пыльцы *in vivo*, G. Gavazzi с соавторами показали, что в условиях *in vitro* было получено большее количество и иной спектр мутаций [347]. Следует отметить, что у одного соматклона часто наблюдали изменения сразу по нескольким признакам [113, 191, 519]. Например, у регенерантов картофеля было установлено, что различия встречались по 22 из 35 исследованных признаков, при этом модальный класс из 15 соматклонов отличался от сорта по 4 признакам, а один соматклон – не менее чем по 17 признакам [192].

О.А. Рожанская показала, что у регенерантов эспарцета, нута, сои и люцерны соматклональная изменчивость увеличивала фенотипическое разнообразие посредством образования вариаций, распределенных симметрично относительно признаков исходного генотипа, при этом были выявлены фенотипы, свойственные дикорастущим видам. Соматклональная вариабельность приводила к нарушению взаимодействий генотип-среда, характерных для исходного сорта, о чем свидетельствовало изменение корреляций морфобиологических и биохимических признаков внутри популяций соматклонов по сравнению с исходным генотипом. Установлено, что размах и частота встречаемости соматклональной изменчивости люцерны превосходили уровень

варьирования форм, полученных при действии химического мутагена, а соматклоны сои имели меньшую частоту негативных вариаций по сравнению мутантами, полученными при облучении [179].

О.В. Дубровной среди диплоидных регенерантов свеклы были выявлены растения с измененными листьями и стерильные, а среди тетраплоидных – отличающиеся по окраске и форме листа, а также карликовые формы. Анализ семенного потомства  $R_1$ - $R_2$  показал, что большинство изменений имели модификационную природу, однако часть измененных признаков (мужская стерильность, форма листовой пластинки и окраска жилок листа) наследовалась, что свидетельствовало об их генетической природе [49].

В последние годы для выявления соматклонов, наряду с изучением хромосом, электрофоретических спектров изоферментов, морфологических и хозяйственных признаков, все чаще применяют молекулярный анализ ДНК, который позволяет с большей точностью оценить истинный уровень генетической изменчивости [8, 47, 49, 94, 132, 134, 208, 224, 420, 446]. Так, с помощью RAPD-метода были установлены генетические различия между регенерантами и исходной линией кукурузы A188, которые превысили уровень изменчивости при их фенотипическом и генетическом анализе [224], а у гороха было показано, что уровень генетического полиморфизма между растениями, полученными из каллусов (культивируемых от 8 месяцев до 10 лет), и исходными линиями варьировал от 0 до 15% [8].

Значительный интерес представляют работы, в которых было изучено влияние на проявление соматклональной изменчивости отдельных факторов, так как это может позволить регулировать этот процесс, а возможно, и направленно получать определенные типы изменений. В ряде исследований было показано, что частота возникновения, а иногда и характер изменений соматклонов, зависели от генотипа, длительности культивирования каллуса, состава питательной среды, типа экспланта и некоторых других факторов [16, 47, 191, 192].

Существенные различия по способности к индукции соматклональных вариантов выявлены у разных видов и сортов растений. Например, частота появления соматклонов у пшеницы сорта Мироновская-808 составила 1,8%, у Мироновской-61 – 4,7% [37]. Для некоторых генотипов пшеницы было показано появление среди регенерантов 29% анеуплоидных форм; у кукурузы для одних сортов описано 2% анеуплоидов, а для других – до 90% [цит. по 191].

Н.К. Бишимбаева также отмечала, что характер изменений признаков у изученных соматклонов пшеницы существенно зависел от исходного генотипа и значительно различался у разных сортов и гибридов [16]. Так, у регенерантов, полученных у сорта Отан наблюдали тенденцию к выщеплению короткостебельных и карликовых форм. Тогда как у соматклонов сорта Целинная-3С, напротив, обнаружены высокорослые скороспелые линии, а у сорта Казахстанская-25 получены соматклоны с антоциановой окраской ушка [16]. Среди регенерантов табака было до 90-94% морфологически отличающихся, стерильных и аномальных растений [26, 226]. У культурного картофеля сорта Зарево было получено 80% измененных форм, а у дикого вида *Solanum pinnatisectum* все регенеранты имели типичную морфологию и число хромосом [191]. В работе Н.О. Юрьевой была показана зависимость частоты и типов соматклональных изменений от сорта картофеля. Анализ регенерантов показал, что у сорта Любимец формы, превышающие исходный сорт по продуктивности, встречались в 4 раза чаще, а по содержанию крахмала – в 7 раз чаще, чем у сорта Смена. По устойчивости к фитофторозу, наоборот, частота встречаемости положительных вариантов была в 3 раза выше у сорта Смена [232]. У диффенбахии также было показано влияние сорта – среди регенерантов сорта Camouflage обнаружили 40,4% вариантов, а у сорта Camille только 2,6% [548].

Имеются отдельные данные о влиянии типа экспланта на получение соматклонов. Так, у регенерантов картофеля из каллусных тканей листового происхождения было обнаружено 12,3% измененных растений, а из каллуса, индуцированного из лепестков, – 50,3% [191]. Для хризантемы было показано, что растения, индуцированные из каллусов, полученных из эпидермиса лепестков, характеризовались увеличением размера соцветий по сравнению с регенерантами из каллусов, полученных из цветоножек [309].

В ряде исследований было установлено влияние на изменчивость культивируемых клеток состава питательных сред, и в частности, регуляторов роста [112]. У некоторых видов выявлено действие этого фактора и на получение регенерантов, например, у земляники частота соматклонов увеличилась с возрастанием уровня гормонов в среде [556]. В работе А.О. Марченко показано, что при культивировании эмбрионного каллуса винограда на среде с добавлением 1 мг/л 2,4-Д у полученных растений отсутствовали фенотипические изменения, а при использовании 3 мг/л 2,4-Д регенеранты различались по

морфологическим и фенологическим признакам [129]. У спаржи регенеранты, полученные путем соматического эмбриогенеза из протопластов на среде с НУК, были кариотипически нормальны, а с 2,4-Д – имели хромосомные aberrации [445]. Интересна в этом плане работа Р.В. Ковбасенко с соавторами, в которой было показано, что введение в состав питательной среды некоторых регуляторов роста, используемых в растениеводстве для повышения урожайности и устойчивости к болезням, способствовало индукции определенных соматических изменений у томатов. Так, культиар и нарцисс стимулировали у регенерантов образование нового соцветия сложной кисти, что способствовало повышению продуктивности. При введении в среду фуrolана и пикса формировались твердые плоды, приспособленные к лучшей транспортировке и хранению. Новые раннеспелые сорта томата были получены на средах с добавлением  $\text{AgNO}_3$ , АБК и крезацина. Манипулирование различными регуляторами роста позволило авторам успешно конструировать растения томатов с ценными хозяйственными признаками [102]. У регенерантов баклажана, полученных путем соматического эмбриогенеза на среде с НУК, частота возникновения вариаций массы растения, формы листа и плода, фертильности была выше, чем при использовании 2,4-Д [374]. В то же время Л.А. Кучеренко с соавторами отмечали, что выход и спектр вариантных форм у риса не зависели от условий культивирования, в том числе от применяемых гормонов [113].

Длительность культивирования каллусной ткани – очень важный фактор, влияющий на изменчивость клеток *in vitro*, которая, судя по многочисленным данным, у большинства видов усиливалась с увеличением пассажа [112]. Для регенерантов также было показано возрастание изменчивости при их индукции из каллусов более поздних пассажей [37, 47, 192, 224, 232]. Например, сравнение растений кукурузы, полученных из каллусов через 4 и 8 месяцев культивирования, показало возрастание изменчивости с возрастом культуры [224]. М.Д. Garsia с соавторами показали, что у кукурузы при увеличении сроков регенерации растений от одного до трех лет число фенотипических и хромосомных аномалий увеличилось с 30 до 92%. При этом у 70% соматических клонов было анеуплоидное число хромосом [345]. Среди регенерантов овса сорта Тиресаное частота хромосомных aberrаций после 4-х месяцев культивирования каллуса составила 49%, а после 20-ти – 88%, а у сорта Lodi в этот период частота растений по

этому показателю возросла с 12 до 48% [192]. При анализе регенерантов свеклы, полученных из каллусов разных пассажей, О.В. Дубровная установила, что наибольшее количество генетически измененных форм выявлялось среди растений из каллусов 9-10-го пассажей [49]. Длительность культивирования по некоторым данным могла влиять и на характер возникающих признаков. При анализе соматклонов томатов сорта Ликирич М.И. Грати с соавторами выявили увеличение изменчивости по длине вегетационного периода, массе плода и продуктивности. При этом длительное пассирование каллуса способствовало повышению продуктивности регенерантов – прибавка урожая растений из 1-2-го пассажей составила 4-5%, 3-4-го – 24-32%, а 5-6-го – 87-97% [40]. Для гороха также было установлено возрастание частоты появления соматклональных вариантов с увеличением продолжительности пассирования каллусной ткани [195]. Однако при очень длительном субкультивировании могут возникать и негативные изменения [8, 47, 342]. Так, у регенерантов из каллусов гороха, культивируемых 10-15 лет, наряду с удлинением периода вегетации и изменением ветвления стебля, обнаруживались мелколистность, дефектное развитие цветка, стерильность пыльцы и пониженная всхожесть семян [8]. У эспарцета увеличение числа пассажей каллуса способствовало повышению устойчивости регенерантов к листовым инфекциям [179]. Интересные данные по влиянию длительности культивирования на характер соматклональной изменчивости у картофеля были получены в исследованиях Н.О. Юрьевой. Установлено, что формы с повышенной по сравнению с исходным сортом Смена продуктивностью, чаще встречались при регенерации из каллусов ранних 2-4-го пассажей, что, по мнению автора, связано с индукцией морфогенеза из клеток с наиболее сбалансированным метаболизмом в молодых каллусах. Из каллусов 3-4-го пассажей чаще формировались растения с повышенной мощностью, а подавление развития, также как и низкую продуктивность, наблюдали у соматклонов из 6-8-го пассажей. В то же время регенеранты с повышенной устойчивостью к фитофторозу, по сравнению с исходным сортом, были получены преимущественно из тканей 7-8-го пассажей [232]. Необходимо отметить, что в некоторых исследованиях не было установлено влияния пассажа – например, у диффенбахии уровень соматклональной изменчивости растений, полученных путем органогенеза при культивировании каллуса в течение 8 и 16 месяцев был сходным [548].

На уровень изменчивости регенерантов может влиять тип морфогенеза, при этом растения, полученные путем геммогенеза, обычно имеют большую генетическую изменчивость, чем растения, регенерировавшие из соматических зародышей [112]. В работе D.L.P. Pinto с соавторами отмечена стабильная плоидность у растений маракуйи, цикламена и других видов, полученных путем непрямого соматического эмбриогенеза [503]. Поэтому соматический эмбриогенез чаще используется для микроразмножения и получения искусственных семян [134, 138, 291, 420, 491, 554].

Суммируя представленные данные, хотелось бы отметить некоторые закономерности соматической изменчивости, прежде всего установленные для томатов, пшеницы, кукурузы и некоторых других злаков [37, 90, 112, 192, 224]. Соматическая изменчивость может проявляться по широкому спектру признаков – морфологическим, цитогенетическим, биохимическим. При этом наблюдается вариабельность по качественным и количественным признакам как в положительную, так и в отрицательную сторону; мутации затрагивают признаки, находящиеся под моногенным и полигенным контролем; отдельный соматоклон может нести изменения сразу по нескольким признакам; некоторые мутации были получены впервые; соматические мутанты могут быть рецессивным, доминантным и кодоминантными; мутации могут затрагивать как ядерный, так цитоплазматический геном; соматоклоны могут сочетать признаки, которые невозможно или трудно соединить в одном генотипе традиционным путем; соматическая изменчивость зависит от многих факторов.

Некоторые из перечисленных особенностей соматической изменчивости обеспечивают преимущества ее практического использования, к которым можно отнести: появление с высокой частотой изменений ценных признаков; возникновение редких мутаций, которые не удается получить традиционными способами; возможность проведения улучшения сортов по отдельным признакам за короткий период; вероятность сочетания в одном соматоклоне нескольких хозяйственно важных признаков; возможность получения разнообразных генотипов у видов с ограниченной генетической базой вариабельности. Получение соматических вариантов позволяет расширить генетическую изменчивость и получить исходный материал, что ускоряет процесс селекции и в комплексе с традиционными методами

способствует эффективному созданию новых сортов.

Для успешного использования соматклональной изменчивости в селекции необходимо учитывать недостатки и ограничения этой клеточной технологии. Среди таких проблем следует указать на отсутствие надежных методик регенерации растений, снижение морфогенного потенциала по мере пассирования каллусов, часто встречающуюся стерильность регенерантов или высокий процент химерных растений, низкую частоту соматклональных изменений у некоторых генотипов, отсутствие направленности получения желаемых для селекционера признаков, а также изменение признаков не только в сторону их улучшения, но и ухудшения. Тем не менее, детальное исследование процесса соматклональной изменчивости может позволить свести к минимуму некоторые из этих недостатков при разработке биотехнологий.

Использование индуцированного мутагенеза *in vitro* предоставляет более широкие возможности для увеличения изменчивости культивируемых клеток. К настоящему времени накоплен обширный фактический материал о действии различных химических и физических мутагенов на изолированные ткани и органы у ряда видов растений [12, 37, 94, 111, 130, 134, 147, 159, 160, 191, 222, 226, 549, 573]. В культуре *in vitro*, как и при работе с целыми растениями, применяют физические факторы, в частности, ионизирующее (рентгеновские и гамма-лучи) и ультрафиолетовое излучение, а также химические вещества – N-нитрозометилмочевину (НММ), N-этил-N-нитрозомочевину (НЭМ), этилметансульфонат (ЭМС), 1,4-бис-диазоацетилбутан (ДАБ) [12, 37, 117, 138, 191, 223, 226, 596]. Имеются данные об эффективном использовании колхицина или других антимицротрубочковых соединений для полиплоидизации с целью преодоления стерильности и получения фертильных форм при отдаленной гибридизации у лука, некоторых злаков, плодовых растений [37, 130, 147, 160], а также для получения полиплоидов у винограда [111, 549, 604], котовника [85], зизифуса [363], апельсина [544]. У некоторых видов под действием колхицина *in vitro* образовывались не только тетраплоиды, но и анеуплоиды или другие измененные формы [37, 147, 149, 316, 467, 573, 590].

В качестве объекта мутагенной обработки в разных исследованиях использовали изолированные органы (почки, микрочеренки, зародыши, пыльники, донца луковиц) [12, 85, 90, 130, 222, 363, 573], каллусы [14, 37, 112, 149, 604], культуру клеточных суспензий [117, 157, 189, 226, 316,

400, 596] или протопластов [191, 544]. При работе с мутагенами в культуре тканей необходимо учитывать негативное влияние многих химических мутагенов на процессы каллусо- и морфогенеза, а также их возможное взаимодействие с компонентами питательной среды. Подбор оптимальной дозы мутагенного вещества должен проводиться с учетом не только максимального мутагенного воздействия, но и необходимости поддержания на определенном уровне процессов клеточной дифференциации. В исследованиях В.С. Гирко была обнаружена зависимость регенерационной способности каллусов, полученных из незрелых зародышей пшеницы, от типа мутагена и дозовой нагрузки, а также показано снижение способности к морфогенезу и значительное ослабление полученных после мутагенной обработки растений [37]. На чувствительность клеточных культур к мутагену оказывали влияние генотип, тип экспланта и стадия его развития, условия обработки и другие факторы [191, 226]. Так, В.П. Банникова с соавторами показали, что у пшеницы обработка НММ усиливала изменчивость (появлялись карликовые и устойчивые к мучнистой росе регенеранты), однако происходило ингибирование развития эмбриогенных каллусов и регенерации, которое зависело от сорта. Частота измененных растений в поколении R<sub>2</sub> у сорта Харьковская 11 возрастало до 10,7% (в контроле 0%), а у сорта Лютеценс, наоборот, снижалась до 1,4% (в контроле 3,8%) [12]. Для хризантемы была показана эффективность применения мутагенеза для получения изменений окраски цветка у регенерантов, при этом выявлена зависимость от типа экспланта (мутации окраски цветка лучше индуцировались при использовании сегментов лепестков и бутонов, чем листьев) и способа  $\gamma$ -облучения [473].

Метод мутагенеза *in vitro* имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционным мутагенезом на уровне целых растений, так как позволяет быстрее и с меньшими затратами получить широкий спектр изменчивости, но самое важное – снизить вероятность развития химерных и миксплоидных форм, особенно при соматическом эмбриогенезе, когда развитие происходит из одной клетки. Сочетание спонтанной соматоклональной изменчивости и индуцированного мутагенеза *in vitro* позволяет существенно увеличить частоту соматоклональных вариаций, а в некоторых случаях и расширить спектр изменчивости [12, 37, 191, 226]. Показано, что уровень индуцированной НММ изменчивости в культивируемых клетках диоскореи, табака, юкки и некоторых других видов превосходил уровень спонтанной

генетической вариабельности не менее, чем на 1-2 порядка [400]. У кукурузы использование изменчивости культивируемых клеток и мутагенной обработки 1,4-бис-диазоацетилбутаном обеспечило большую частоту и спектр измененных фенотипов по сравнению с соматклональной вариабельностью [223].

Мутагенез в культуре изолированных тканей применяется в нескольких направлениях. Предварительная мутагенная обработка часто используется как один из этапов в клеточной селекции, так как позволяет повысить уровень изменчивости клеток и, следовательно, эффективность отбора нужных генотипов [14, 37, 117, 191, 214, 226, 592]. Так, в исследовании В.И. Ошариной с соавторами показано, что при обработке суспензионной культуры табака НММ частота полученных при клеточной селекции клонов, устойчивых к NaCl, возростала в 1,5 раза, а резистентных к этионину – в 5,4 раза [157]. Особенно эффективна предварительная мутагенная обработка при создании клеточных линий-продуцентов вторичных метаболитов или мутантных клонов [26, 112, 134, 153, 226]. С другой стороны, мутагенез *in vitro* используется и как самостоятельный прием, позволяющий увеличить выход измененных генотипов и создать разнообразный исходный материал – мутантные формы, в том числе полиплоиды и анеуплоиды [12, 37, 85, 134, 159, 223, 255, 473, 544, 549].

Среди различных клеточных технологий, позволяющих расширить генетическое разнообразие, особого внимания заслуживает клеточная селекция [94, 191]. Эта биотехнология позволяет, в отличие от получения соматклонов, осуществлять направленный скрининг генотипов с заранее заданными свойствами, что так привлекательно для селекционных программ. Высокая эффективность этого метода обеспечивается за счет того, что отбор ценных форм проводится на уровне культивируемых тканей и клеток, что позволяет манипулировать с огромным числом генотипов [26, 134, 519]. Для выделения устойчивых клеточных линий, а также мутантов и соматклональных вариантов применяют разные методы клеточной селекции: прямую, непрямую, тотальную, визуальную селекцию и неселективный отбор [191]. В растениеводстве для получения генотипов, устойчивых к засолению, засухе, экстремальным температурам, болезням, гербицидам, солям тяжелых металлов обычно используется прямая селекция [37, 90, 99, 117, 226, 511]. При таком подходе в питательную среду вводится селективный фактор, с помощью которого моделируется действие стресса.

Технологии клеточной селекции, разрабатываемые для основных сельскохозяйственных культур, основываются на имеющихся общих механизмах устойчивости для изолированных клеток и целых растений [79, 105, 191]. Основное число исследований проведено по изучению стрессовых факторов, наносящих наибольший вред сельскому хозяйству, таких как засуха, засоление, низкие температуры и болезни [37, 47, 49, 90, 94, 117, 214, 511]. Для получения генотипов, устойчивых к засолению почв, у пшеницы, ячменя, риса, сои, табака, картофеля, люцерны, свеклы, бамбука, малины, березы, тополя в питательные среды добавляли NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> или морскую соль [24, 37, 49, 51, 90, 113, 117, 157, 205, 213, 253, 308, 365, 438]. Для имитации действия засухи использовали неионные осмотики – маннит, сорбит, ПЭГ, а иногда ионный осмотик NaCl [14, 37, 47, 90, 117, 214, 230, 317, 565]. В последнем случае можно получить соли- и засухоустойчивые формы [51, 191]. При отборе на устойчивость к болезням проводят совместное культивирование растительных клеток с патогеном или в питательную среду вводят патотоксины [172, 191, 218], а чаще, – фильтраты культуральной жидкости [30, 37, 89, 90, 118].

Исследований, посвященных разработке методов клеточной селекции на устойчивость к низким температурам, немного. При отборе морозоустойчивых линий *in vitro* часто используют несколько этапов, включающих закаливание культур при положительных температурах, промораживание до –12-20°C и оттаивание [37, 121, 136, 268, 343, 413, 527]. У некоторых видов для отбора холодоустойчивых генотипов использовали низкие положительные температуры. В частности, у риса селекцию проводили при +10-13°C [113, 311], у хризантемы при +8°C [592], у кукурузы при +4°C [324], а у картофеля использовали диапазон от 0 до +18°C [35]. Интересный подход для получения морозоустойчивых линий пшеницы применили Н. Tantau и К. Dorffling, которые на среде с оксипролином отобрали сверхпродуцирующие пролин клеточные линии, значительная часть которых показала повышенную устойчивость к этому фактору [566].

В клеточной селекции очень важную роль играет выбор объектов для отбора. Одним из наиболее доступных объектов является каллусная культура, которую с успехом использовали при отборе генотипов, устойчивых к биотическим и абиотическим стрессовым факторам, у пшеницы, ячменя, табака, люцерны, картофеля, риса, сои, кукурузы, сахарной свеклы [14, 24, 47, 49, 89, 117, 118, 121, 157, 213, 214, 230, 446, 592]. При работе с данным объектом необходимо учитывать, что

выделение устойчивых клеток может осложняться их "маскировкой" клетками дикого типа и неодинаковым доступом стрессового фактора ко всем клеткам каллуса. Многие из этих недостатков нивелируются при использовании суспензионной культуры. Достаточно успешно применяли суспензию у люцерны, картофеля, табака, сои при клеточной селекции на устойчивость к засолению, болезням, осмотическому стрессу, солям тяжелых металлов [34, 37, 117, 157, 172, 189, 208]. Значительно реже в качестве объектов для отбора *in vitro* использовали изолированные органы. В частности, изолированные зиготические зародыши применяли в селекционных схемах у ячменя, кокосовой пальмы, пшеницы [90, 134, 191, 401]. У *Ipomoea batatas* отбор устойчивых к хлоридному засолению форм проводили с использованием стеблевых апексов [308]. Для отбора устойчивых к солевому стрессу форм тополя и березы использовали микрочеренки [205]. Культура изолированных органов иногда применяется для косвенной оценки селекционного материала на толерантность к стрессу [90, 565]. Достаточно эффективным является последовательное применение различных объектов, которое, например, было использовано для получения форм люцерны, устойчивых к фузариозу [90] и осмотическому стрессу [317].

Особого внимания заслуживают факты получения в одной селективной системе клеточных линий или растений, обладающих устойчивостью к различным стрессам. Например, О.В. Дубровная с соавторами показали, что при использовании в качестве селективного фактора NaCl у сахарной свеклы были выделены линии, устойчивые к засолению и низкой температуре [49]. У кормовой свеклы были получены каллусные линии, устойчивые к токсину возбудителя бактериоза, которые проявили устойчивость и к низкотемпературному стрессу [41]. Ю.И. Долгих установила, что у кукурузы проведение отбора клеток на среде с ПЭГ способствовало повышению устойчивости регенерантов не только к засухе, но и к засолению и низкой температуре [47]. Показана эффективность применения вольфрамат-анионов для селекции клеточных линий сои с комплексной устойчивостью к манниту, хлоридному и сульфатному засолению [208]. При селекции на устойчивость к солевому и водному стрессам у табака были получены формы, устойчивые не только к этим факторам, но и к черной корневой гнили [117]. У ячменя, с использованием нескольких стрессовых факторов, получены генотипы с комплексной устойчивостью к повышенной кислотности, токсичности алюминия и тяжелых металлов [230].

Формирование устойчивости растений к ряду абиотических стрессов (солевому, осмотическому, температурному) на клеточном и тканевом уровне имеет некоторые сходные механизмы и в значительной степени связано с синтезом пролина и АБК [79, 105, 117, 191]. Поэтому эти вещества иногда применяют в качестве селективных агентов при отборе линий, устойчивых к различным стрессам. У табака и сои при селекции к токсическому аналогу пролина выделены линии, устойчивые к NaCl, осмотическому и низкотемпературному стрессам [48]. Эти данные свидетельствуют о возможности получения ценного селекционного материала, устойчивого к нескольким стрессовым факторам в одной селективной системе.

Анализируя литературные данные, практически нельзя найти двух одинаковых схем клеточной селекции *in vitro*. В каждом конкретном случае эта схема зависела от вида растения, признака, к которому получали устойчивые формы, особенностей каллусо- и морфогенеза, степени проработки методик, изученности действия стрессового фактора и других, порой субъективных, причин. В одних случаях исследователи использовали однократный отбор с небольшой экспозицией стрессового фактора – в частности, у кукурузы и пшеницы применили селекцию на фоне ПЭГ и NaCl с недифференцированным каллусом в течение пассажа, а регенерацию проводили без стрессового фактора [47, 214]. Отбор селекционного материала пшеницы на устойчивость к биотическим факторам также осуществляли при непродолжительном действии селективного фактора (до 4-6 недель) с использованием как неморфогенного, так и морфогенного каллуса [30, 37]. Во многих работах применяли более сложные схемы – ступенчатый отбор с повышением дозы стрессового фактора, при этом после снятия селективного давления отобранные линии часто подвергали повторной стрессовой обработке [49, 51, 89, 118, 157, 172, 205, 214, 438, 446]. При таких схемах селекции отбор проводился в течение 8-12 пассажей – например, при получении соле- и осмоустойчивых линий табака [117, 157], устойчивых к NaCl линий яровой пшеницы [51], солеустойчивых линий люцерны [117]. Так, в работе О.В. Дубровной с соавторами у сахарной свеклы при клеточной селекции каллусы последовательно культивировали по 3 пассажа на средах с 1,5, 2,0 и 2,5% NaCl [49].

В ряде исследований показана эффективность включения в схему селекции мутагенной обработки [14, 117, 189, 214, 592]. Активно обсуждается вопрос о целесообразности присутствия стрессового

фактора в средах при индукции морфогенеза. Во многих работах действию стрессового фактора подвергали неморфогенные каллусы, а затем из отобранных линий регенерировали растения [14, 47, 89, 172, 191, 214]. Часто это связано с тем, что морфогенная способность в условиях селективной нагрузки снижалась. Например, при получении клонов риса, резистентных к NaCl, ПЭГ, этионину, в связи с этим рекомендовалось снятие селективного давления на этапе морфогенеза [14]. С другой стороны, многие исследователи считают более эффективным присутствие селективного фактора в период индукции морфогенеза и регенерации растений [30, 37, 47, 117, 218, 254, 324, 438, 446]. В работах по клеточной селекции пшеницы на устойчивость к засолению, низким температурам и болезням также указывалось на целесообразность использования морфогенных каллусных культур [37, 51]. Это обусловлено тем, что недифференцированный каллус после обработок стрессовыми факторами в течение многих пассажей терял способность к индукции морфогенеза. Например, у люцерны после длительной клеточной селекции из 96 устойчивых к этионину клеточных линий растения были получены только у 24 линий [117].

Некоторые исследователи показали влияние на устойчивость клеточных культур к стрессовым воздействиям генотипа, типа экспланта, состава питательной среды, условий культивирования и других факторов [37, 90, 118, 121, 254, 308, 565]. Так, А.С. Лукаткин установил, что у огурца холодоустойчивость каллусных культур возрастала с увеличением возраста исходного растения, повышением концентрации БАП в питательной среде и при выращивании в темноте. При этом максимальное повреждение при действии стресса наблюдалось у культур, полученных из меристем и гипокотыля, а минимальное – из семян [121].

Необходимо отметить, что клеточная селекция, наряду с преимуществами, имеет и ряд существенных ограничений: признак, на который ведется селекция, должен моделироваться в условиях *in vitro*; не все признаки, проявляющиеся на уровне клетки, сохраняются при регенерации целого растения. Кроме того, необходимо учитывать, что механизмы адаптации клетки и организма к стрессам могут быть разными. Именно многообразием и слабой изученностью различных приспособительных механизмов и формирования резистентности к стрессовым факторам среды у растений и объясняются возможные неудачи селекции *in vitro*. Во многих работах отмечалось снижение

частоты регенерации у устойчивых линий [49, 446], а также получение лишь устойчивых клеточных линий или единичных растений [14, 118, 191, 317, 566]. В ряде случаев растения из устойчивых линий были стерильными [494], имели аномалии развития, морфологии и плохо приживались при адаптации *in vivo* [14, 47, 48, 117, 259, 317, 324, 446]. Устойчивость к стрессовому фактору часто проявлялась не у всех регенерантов, или не наследовалась в потомстве [113, 191]. По-видимому, такие факты связаны с недостаточной разработанностью методологии клеточной селекции и сложностью сохранения морфогенного потенциала при длительных многоступенчатых отборах.

Разработка клеточных технологий, основанных на соматоклональной изменчивости, активно проводится последние 2-3 десятилетия с основными сельскохозяйственными культурами. При этом, несмотря на многие существующие проблемы, у ряда видов растений получен ценный селекционный материал и создано более 50 сортов [16, 37, 49, 94, 102, 112, 113, 134, 191, 205, 224, 230, 463, 480, 517]. В частности, получены формы картофеля с повышенной урожайностью и устойчивые к фузариозной гнили [89], сои, нута, рапса, эспарцета и люцерны – с повышенной продуктивностью, устойчивостью к засухе и патогенам [179], кукурузы – с комплексной устойчивостью к абиотическим стрессам [47], риса – скороспелые, длиннозерные, с высокой урожайностью [113], табака – устойчивые к засухе, засолению, болезням [117], а также солеустойчивые формы ячменя и устойчивые к фузариозу образцы люцерны [148]. У ячменя на основе регенерантов, адаптированных к неблагоприятным почвенным условиям, созданы сорта, которые превосходят стандарт по урожайности и имеют высокую продуктивную кустистость (выше стандарта на 29-67,5 %) как на благоприятных, так и кислых почвенных фонах [230].

### **1.3 Некоторые аспекты клонального микроразмножения растений *in vitro***

Среди различных клеточных технологий наиболее изученным и активно используемым в растениеводческой практике является клональное микроразмножение, при котором используют технику *in vitro* для быстрого получения неполовым способом растений, генетически идентичных исходным [94, 115, 291]. Методы микроразмножения разработаны для более тысячи [134], а по некоторым данным, даже двух тысяч видов растений [491], при этом для более ста видов эти методы

нашли широкое коммерческое применение. Почти три десятилетия клональное микроразмножение активно используется у цветочно-декоративных, плодово-ягодных, технических, овощных, древесных, лекарственных и других видов растений [16, 29, 31, 138, 144, 155, 156, 174, 193, 211, 216, 219, 291, 581]. Такое интенсивное внедрение биотехнологий размножения *in vitro* обусловлено их значительными преимуществами, по сравнению с традиционными способами, которые позволили решить многие проблемы семеноводства и существенно ускорить и облегчить селекционный процесс. К основным преимуществам относятся: высокий коэффициент размножения ( $10^5$ - $10^6$  растений в год), генетическая стабильность размноженных растений, получение оздоровленного посадочного материала, круглогодичное размножение в лабораторных условиях, что исключает влияние погоды, климата, возможность размножения стерильных отдаленных гибридов, гаплоидов и другие [15, 26, 134, 420, 480]. Очень важным является возможность быстрого размножения ценного селекционного материала (в том числе и полученного биотехнологическими методами) и ускоренного внедрения новых сортов в производство. Например, у винограда сроки внедрения нового сорта могут быть уменьшены с 18 до 2-3 лет [193]. Клональное микроразмножение *in vitro* имеет природоохранное и ресурсосберегающее значение и используется в программах сохранения редких и исчезающих видов растений, а также при создании генетических банков растительной плазмы [29, 94, 134, 138, 143, 155].

К настоящему времени разработаны различные классификации методов размножения в культуре тканей. Т. Мурасиге выделил 6 методов микроразмножения [470], В.С. Шевелуха с соавторами [187] и Г.С. Муромцев с соавторами [156] – 4 метода, В.А. Высоцкий – 3 метода [31]. Р.Г. Бутенко предложила 5 типов размножения *in vitro*: микрочеренкование, образование микроклубней и микролуковиц, индукция адвентивных почек, подавление апикального доминирования и развитие пазушных почек, размножение в биореакторах микроклубнями [26]. М.Д. Мельничук с соавторами указывали на 2 основных типа микроразмножения: активация существующих в интактном растении меристем и индукция образования почек или эмбриоидов (из тканей экспланта, из первичного или субкультивированного каллуса или суспензии) [134]. Суммируя предложенные классификации, можно отметить основные методы: активация развития уже существующих в растении меристем, индукция прямого морфогенеза из тканей экспланта,

индукция непрямого морфогенеза из каллусных или суспензионных культур, микрочеренкование.

У большинства видов растений чаще всего используется метод активации развития меристем при введении в культуру вегетативных верхушечных или пазушных почек, который позволяет с наибольшей вероятностью получить генетически стабильный материал. Меристематические ткани растения непрерывно поддерживаются в активно пролиферирующем состоянии, они устойчивы к генетическим изменениям, вследствие высокой активности систем репарации ДНК, а также негативной селекции изменившихся клеток [26, 112].

Помимо культуры меристем у многих видов для размножения с успехом применяют прямой морфогенез, при котором происходит регенерация растений путем органогенеза или соматического эмбриогенеза непосредственно из тканей экспланта, без образования каллуса [29, 134, 138, 156, 174, 291, 420]. Формирование придаточных почек обычно начиналось из эпидермальных или субэпидермальных слоев эксплантов, в качестве которых использовались сегменты листа, стебля, черешка, семядолей, чешуек и донца луковицы, зрелых и незрелых зародышей [15, 49, 187, 219, 476]. Во многих работах более эффективным оказалось применение в качестве эксплантов ювенильных тканей проростков *in vitro* [49, 84, 138]. Для индукции прямого морфогенеза исследователи обычно вводили в питательные среды один цитокинин, или сочетали его с ауксином, при этом в последние годы у многих видов в качестве индуктора адвентивных почек успешно применялся тидиазурон [138, 420]. В условиях *in vitro* прямая регенерация побегов из разных эксплантов получена у орхидных, клематиса, зизифуса, каладиума, фикуса, киви, хурмы, актинидии, земляники, малины, капусты, сахарной свеклы, лилии, гиацинта, гладиолуса, лука, тюльпана, ириса, нарцисса и многих других растений [29, 49, 174, 187, 219, 306, 325, 493]. Нужно отметить, что при таком способе размножения (особенно при прямом органогенезе) полностью не исключается появление генетически неоднородного потомства. Однако простота этого метода, высокий коэффициент размножения и относительно быстрые сроки делают его очень распространенным у многих сельскохозяйственных и, особенно, декоративных культур [26, 29, 138, 219].

Метод микроразмножения, основанный на непрямом морфогенезе в первичном или пассируемом каллусе, гораздо реже используется для получения посадочного материала из-за высокой вероятности индукции

соматональных изменений, что было рассмотрено выше. Тем не менее, этот метод с успехом был применен у видов, для которых были подобраны условия, обеспечивающие генетическую стабильность регенерантов, в частности, у моркови, табака, вяза, аспарагуса, хризантемы [31], сахарной свеклы, пшеницы, риса, подсолнечника, льна [15], масличной и финиковой пальмы, кофе [46], а также ряда цветочно-декоративных растений [138, 219]. Для целей микроразмножения более подходящим является непрямой соматический эмбриогенез, который обеспечивает большую стабильность полученных растений, по сравнению с органогенезом [112, 554]. В последние годы соматический эмбриогенез стал более востребованным, благодаря разработке технологий создания искусственных семян, которые представляют собой соматические зародыши, заключенные в специальные гелевые капсулы. Совершенствование методик высушивания зародышей и их капсулирования позволило приблизить их по качеству к настоящим семенам и использовать для посева в почву, что гораздо проще и дешевле, чем адаптация регенерантов к условиям *in vivo*. Искусственные семена были получены с использованием не только соматических зародышей, но и пазушных и адвентивных почек у моркови, люцерны, риса, винограда, шелковицы, эвкалипта, банана, кардамона, перца и других видов [112, 491, 554].

Как уже указывалось, чаще всего для размножения *in vitro* применяют метод, обычно называемый «культурой меристем», который не только обеспечивает максимальную генетическую стабильность, но и позволяет проводить оздоровление растений от вирусной, бактериальной, грибной и других видов инфекций (особенно при сочетании с термо- или хемотерапией). Этот метод получил наибольшее распространение в селекции и семеноводстве при массовом промышленном получении посадочного материала у многих культур – овощных (картофель, томат, перец), технических (сахарная свекла, хмель, табак), плодово-ягодных (виноград, яблоня, слива, вишня, малина, земляника, смородина), цветочно-декоративных (гвоздика, роза, гербера, хризантема), тропических и субтропических (рододендрон, чай, камелия), древесных растений (тополь, береза, ольха, ива, сосна, ель, секвойя, туя) [27, 31, 140, 122, 127, 131, 132, 144, 145, 187, 193, 211, 219, 280, 291, 420, 594].

В процессе клонального микроразмножения в культуре меристем *in vitro* обычно выделяют 4 основных этапа [134, 187]. На первом этапе при введении меристем в культуру важно получить стерильные

экспланты, обеспечить их хорошую приживаемость и первоначальный рост побега. На втором этапе (собственно микроразмножение) добиваются получения максимального количества мериклонов, что осуществляется при использовании нескольких методов размножения – чаще всего микрочеренкования основного побега и индукции адвентивных побегов [15, 26]. На 3-4-м этапах проводится укоренение побегов, а затем адаптация *in vivo* и выращивание в теплице [187].

Роль факторов, определяющих морфогенез в культуре меристем, была освещена во многих работах, в которых указывалось на важное значение генотипа, физиологического состояния и возраста донорного растения, сезона изоляции, эпигенетической характеристики и размера экспланта, состава и типа питательной среды, условий культивирования *in vitro* [29, 31, 84, 122, 139, 143, 155, 174, 219, 241, 280, 476, 523, 581]. Так, О.И. Молканова отмечала, что основным фактором, определяющим морфогенетические потенции эксплантов, являлась генетическая регуляция. Наибольшая трудность получения стабильно размножающейся культуры меристем отмечена у древесных таксонов, особенно хвойных. Более устойчивой пролиферацией среди изученных 214 видов из 35 семейств характеризовались наиболее эволюционно продвинутые виды *Asteraceae*, *Gesneriaceae*, *Iridaceae*, *Liliaceae*, а самые труднорегенерирующие – *Araliaceae*, *Magnoliaceae*, *Ranunculaceae*. Значительные различия были выявлены и в пределах видов. Так, при культивировании разных сортов сирени коэффициент размножения в культуре меристем варьировал от 2,0 до 27,6 [143].

Важнейшим фактором, обуславливающим развитие меристемных культур, является состав питательных сред. На каждом этапе требуется, прежде всего, применение определенного соотношения и концентраций регуляторов роста. Обычно на 1-2-м этапах в среду добавляют цитокинины, иногда в сочетании с ауксином в меньшей концентрации, а на этапе укоренения – ауксины (ИМК, НУК, ИУК) [26, 187, 420]. Большинство исследований по разработке методик микроразмножения было посвящено оптимизации составов сред для разных этапов, при этом авторы указывали на их значительные отличия у различных генотипов [31, 87, 122, 144, 155, 174, 241, 501].

Во многих исследованиях указывалось на важную роль в процессах регенерации *in vitro* физических факторов культивирования, таких как температура, интенсивность и спектральный состав света и других [94, 142, 155, 514, 603].

При работе с многолетними культурами, особенно кустарниками и древесными, часто отмечалось снижение жизнеспособности и эффективности размножения с увеличением возраста материнского растения [31, 46, 143, 187]. Однако имеются успешные разработки и с использованием 30-40 летних деревьев, в частности, секвойи [145]. Для некоторых видов было установлено влияние расположения экспланта на растении на различные параметры микроразмножения *in vitro*. Например, было показано, что сегменты стебля с узлом из базальной части *Arnica chamissonis* регенерировали в 2 раза больше микропобегов, чем верхушка [84]. У *Lawsonia inermis*, различных сортов *Buddleia* и *Camellia* количество побегов было выше при использовании пазушных меристем, по сравнению с верхушечными [280, 501, 523]. В ряде исследований было установлено влияние на эффективность микроразмножения количества субкультивирований побегов [31, 66, 75, 87, 143, 155, 174, 607]. Так, у представителей семейства *Caprifoliaceae* максимальный коэффициент размножения наблюдался в третьем пассаже, а у *Ericaceae* и *Oleaceae* – в 4-5-м [143]; у вишни и сливы этот показатель также достигал максимума в 4-5-м пассажах [122]. В работе индийских ученых у *Lawsonia inermis* количество побегов из пазушных меристем было стабильным до 5-го пассажа (4,3), а затем снизилось до трех побегов на эксплант [523]. В то же время имеются сообщения о достаточно длительном клонировании *in vitro*. Так, у тополя и березы показана возможность микрочеренкования без признаков онтогенетического старения в течение соответственно 5 и 7 лет [131], у картофеля размножение осуществляли на протяжении 10 лет [127], а у гладиолуса – 11 лет [216].

Необходимо отметить, что, несмотря на широкое практическое использование технологий микроразмножения, имеется ряд проблем, которые снижают их эффективность или затрудняют разработку и применение для новых генотипов. Для некоторых видов сложности связаны с бактериальным заражением или выделением в питательную среду продуктов окисления фенольных соединений, ингибирующих рост эксплантов [46, 216]. Высокая генотипическая зависимость процессов морфогенеза в культуре *in vitro* обуславливает необходимость трудоемкой и длительной оптимизации питательных сред для микроразмножения. В культуре меристем нежелательным явлением на всех этапах микроразмножения является образование каллуса, поскольку это повышает вероятность возникновения соматклонов. Оводненность

микроразмножения, чаще всего возникающая из-за несбалансированного состава среды, также может значительно осложнять разработку технологий размножения. Для исключения этого явления используют уменьшение содержания или удаление из среды гормонов, добавление активированного угля, увеличение концентрации агара или замену его на гелерит [26, 36, 168, 216, 583]. Снижение эффективности клонального размножения может быть из-за низкой частоты укоренения побегов, особенно часто встречающейся у древесных растений [46], или большой гибели пробирочных растений при адаптации *in vivo* [133]. У некоторых видов были разработаны приемы укоренения *in vivo*, при которых микроразмножения выдерживали несколько часов в растворе с высокими дозами ауксина, а затем переносили в почвенный субстрат [31, 82, 187], или укореняли на мхе сфагнуме [143]. В последние годы разрабатываются методики адаптации пробирочных растений с использованием гидропоники [29, 82], аэропоники [96], ионообменных синтетических материалов в виде ионитных смол [27]. Для усовершенствования процесса акклиматизации к условиям *in vivo* в некоторых исследованиях применяли введение в питательную среду ретардантов или антитранспирантов, искусственную микоризацию, опрыскивание листьев раствором глицерина, фотоавтотрофные условия культивирования, температурный градиент в культуральных сосудах [36, 133, 187, 241, 291].

Многие из перечисленных сложностей, многоэтапность и большая трудоемкость процесса размножения в культуре тканей, а также низкий коэффициент размножения у отдельных видов обуславливают высокую стоимость растений, особенно при получении оздоровленного посадочного материала [26, 44, 193, 211, 216]. Поэтому во многих работах уделяется внимание поиску путей повышения эффективности микроразмножения, для чего уменьшают количество этапов, в основном за счет исключения укоренения *in vitro* [25, 143]. Используют также культивирование в жидкой среде в биореакторе пролиферирующих побегов [393, 545], эмбрионных суспензий [134, 545] или микроклубней [26].

Важным вопросом, которому уделяют внимание многие исследователи, является качество размноженных *in vitro* растений. Имеются данные о появлении эпигенетических изменений, классифицируемых как морфозы, у земляники, малины, ежевики, смородины, крыжовника, вишни, розы, яблони, которые проявлялись в

течение 2-3 лет после их микроразмножения [29, 32, 216, 594]. Более существенной проблемой является генетическая нестабильность, особенно при использовании непрямого морфогенеза, поэтому при изучении размноженных растений часто применяется не только морфологический, но и хромосомный, и молекулярно генетический ДНК-анализ [49, 132, 138, 280, 299, 306, 313, 408, 582]. При размножении в культуре меристем, как правило, получают генетически однородный материал [15, 26, 112, 280], хотя изредка появляются сведения о возникновении разных изменений. Например, с помощью RAPD-анализа был выявлен полиморфизм среди мериклонов картофеля [582]. При микроразмножении *in vitro* тополя и осины показана важность молекулярно-генетической оценки внутриклоновой генетической однородности и идентичности размноженных клонов исходным экземплярам [132]. О.В. Дубровная при цитогенетическом анализе растений сахарной свеклы, размноженных путем активации пазушных меристем, обнаружила от 1 до 4% генетически измененных форм, а при прямой регенерации из листовых эксплантов – от 3 до 7% [49]. При регенерации растений путем прямого и, особенно, непрямого морфогенеза часто возникают соматоклональные изменения, однако во многих исследованиях были разработаны технологии клонального микроразмножения, обеспечивающие отсутствие или незначительный уровень генетической изменчивости [138, 241, 306, 313, 408, 476, 491, 554, 564].

#### **1.4 Эфиромасличные растения как объект биотехнологических исследований**

К эфиромасличным растениям, как уже упоминалось, относится несколько тысяч видов, которые способны продуцировать эфирные масла. В данной монографии мы ограничимся, большей частью, исследованиями тех растений, которые произрастают на территории России. Высокая ценность этих видов растений в медицине, парфюмерии, пищевой промышленности обуславливает и интерес к ним с точки зрения биотехнологии. Тем не менее, эфиромасличные растения, судя по имеющейся отечественной и зарубежной литературе, по сравнению с основными сельскохозяйственными культурами, изучены в биотехнологических аспектах крайне слабо. Более подробно вопросы культивирования тканей и органов основных выращиваемых на юге России растений (кориандра, лаванды, шалфея, розы, фенхеля,

тысячелистника и др.) будут рассмотрены в следующих разделах. Здесь мы остановимся лишь на некоторых общих аспектах.

Поскольку для разработки многих клеточных и генноинженерных технологий необходимы методики индукции каллуса и регенерации растений, то этим вопросам посвящена значительная часть имеющихся публикаций. Практически у всех изученных эфиромасличных растений были получены каллусные или суспензионные культуры, которые использовались в дальнейшем для индукции морфогенеза [64, 91, 233, 234, 235, 282, 329, 338, 378, 379, 386, 406, 410, 432, 489, 568, 612] или в исследованиях вторичных метаболитов *in vitro* [65, 529, 178, 263, 266, 298, 301, 339, 340, 384, 433, 518, 541, 580, 596]. В этих работах при изучении каллусогенеза, прежде всего, анализировался состав питательных сред, который существенно варьировал, в зависимости от генотипа и типа экспланта. Для каллусообразования исследователи часто вводили в культуру различные органы взрослых растений, например, у герани – сегменты стебля [282, 502], листа [427, 562], черешка листа [293, 475]; у видов лаванды – экспланты листа [318, 410, 585], верхушки побегов, сегменты стебля [353], бутоны и чашечки цветков [492], у эфиромасличной розы – участки листа, стебля, корня, лепестка и чашечки цветка [265]; у Melissa – сегменты стебля, черешка, листа [234]. Для получения эксплантов у некоторых видов использовали пробирочные растения, полученные из семян *in vitro*, в том числе у *Mentha piperita* [298], *Salvia nemorosa*, *S. africana-lutea*, *S. officinalis* [385, 439, 534, 550], *Coriandrum sativum* [406, 472], *Melissa officinalis* [235, 448], *Foeniculum vulgare* [251], *Achillea millefolium* [338], *Pimpinella anisum* [518], *Pelargonium graveolens*, *P. capitatum* [372], *Origanum vulgare* [233].

Имеются сведения о регенерации растений в первичном или пассируемом каллусе путем органогенеза или соматического эмбриогенеза у *Rosa damascena* [386], *Mentha spicata*, *M. piperita*, *M. citrata*, *M. arvensis* [275], *Achillea ptarmica* [297], *Melissa officinalis* [234, 448], *Ocimum basilicum*, *O. sanctum*, *O. gratissimum* [447], *Artemisia dracunculus* [91], *A. balchanorum*, *A. scoparia* [137], *A. vulgaris* [422], *Lilium candidum* [22] и ряда других видов.

Исследования каллусо- и морфогенеза эфиромасличных растений большей частью направлены на разработку способов регенерации растений *in vitro*, которые могут быть использованы для технологий клонального микроразмножения, а в некоторых случаях для создания новых генотипов. При определении дальнейших возможностей реализации этих методов

важна характеристика полученных в культуре регенерантов, однако таких работ, к сожалению, проведено недостаточно. Чаще всего авторы констатировали сходство регенерантов с исходными формами [270, 406, 432, 568]. Тем не менее, имеется ряд интересных исследований по получению соматоклональных вариаций у некоторых эфиромасличных растений (лаванды, герани, фенхеля и др.), на которые необходимо обратить внимание [1, 152, 322, 372, 378, 417, 516, 535, 551, 586].

Наибольшее число публикаций по эфиромасличным растениям посвящено исследованиям по разработке методик клонального микроразмножения, которые были предназначены для ускоренного размножения или сохранения ценных генотипов (в том числе и редких дикорастущих видов), а также для получения оздоровленного посадочного материала. В качестве эксплантов авторы чаще всего использовали меристемы из пазушных и апикальных почек или сегменты побегов с узлом – у эфиромасличных видов мяты [23, 220, 275, 279, 354, 610], монарды [610], розы [257, 258, 388, 405], герани [162, 570], базилика [247], лаванды [139, 140, 155, 370, 613], полыни [92, 92, 137], шалфея [357, 360, 568, 359], мелиссы [75, 237], душицы [236, 341], тимьяна [207, 260, 418], чабера [571]. В ряде исследований для размножения также применяли индукцию адвентивного побегообразования из сегментов листьев или других органов, например, у *Nepeta cataria*, *Hyssopus officinalis* [138], *Pimpinella anisum* [522], *Mentha* spp. [25, 500], *Satureja avromanica* [466], *Lavandula* spp. [370, 600], *Pelargonium* spp. [372]. У некоторых эфиромасличных растений, в частности кориандра, фенхеля, аниса, лаванды, для этих целей предлагали также использовать индукцию соматического эмбриогенеза, или полученные на этой основе искусственные семена [243, 269, 273, 300, 491, 560, 561]. Большинство из этих работ, в основном было направлено на оптимизацию составов питательных сред для различных этапов размножения *in vitro*. На примере культуры меристем *Coriandrum sativum* был изучен феномен клонового старения при длительном субкультивировании *in vitro* [402]. В течение первых девяти месяцев культивирования происходила реовенилизация зрелых побегов, и формировался ювенильный фенотип, однако через 15-17 месяцев наблюдали уменьшение количества адвентивных побегов, некрозы и гибель клонов из-за их физиологического старения. То есть в условиях *in vitro* происходило не только омоложение, но и накопление возрастных изменений, что свидетельствует о необходимости обновления культур при длительном субкультивировании.

Имеются интересные данные о физиолого-биохимических особенностях растений регенерантов эфиромасличной розы и лаванды при клональном микроразмножении *in vitro* и адаптации *ex vitro* [139, 141, 454].

При микроразмножении эфиромасличных растений для некоторых видов на основании анализа морфологических и хозяйственно-ценных признаков или ПЦР-анализа показана генетическая стабильность полученных *in vitro* растений (у лаванды, герани, мяты, тысячелистника, чабера) [81, 250, 466, 562, 569, 613]. В то же время в других исследованиях у шалфея, лаванды, чабера, герани и некоторых других ароматических растений в ходе микроразмножения были выявлены изменения [256, 327, 466, 576].

Эфиромасличные растения представляют интерес не только в связи с синтезом эфирных масел, но и ряда других ценных биологически активных веществ. Поэтому особое внимание многих ученых было обращено на изучение биосинтеза вторичных метаболитов *in vitro* – число работ по этому направлению у некоторых видов составляет треть от общего числа публикаций по биотехнологии [65]. И если первоначально такие исследования в основном предпринимались для выявления закономерностей биосинтеза отдельных веществ, то в последние два десятилетия они в большей степени направлены на создание альтернативных биотехнологий получения коммерчески ценных соединений. Этому в значительной мере способствовала разработка и использование новых биотехнологических объектов и подходов, что позволило повысить эффективность биосинтеза *in vitro* и выделения целевых продуктов в изолированной культуре [65]. При исследовании вторичного метаболизма у эфиромасличных растений используются каллусные и суспензионные культуры, иммобилизованные клетки, а также культура побегов или генетически трансформированных бородатых корней (“hairy roots”) при выращивании в биореакторах [240, 249, 289, 376, 399, 426, 435, 484, 524, 534, 599]. Для изучения биосинтеза или получения отдельных компонентов эфирных масел у некоторых видов использовалась биотрансформация *in vitro* [97, 178, 348, 541].

Прежде всего, необходимо остановиться на исследованиях, касающихся накопления эфирного масла *in vitro*, так как они представляют собой сложный комплекс многих соединений, а кроме того, часто синтезируются в специализированных эфиромасличных вместилищах, что обуславливает значительные проблемы при их получении в изолированных культурах. В настоящее время известно

несколько десятков растений, у которых в клеточных культурах обнаружены ароматические компоненты, – это виды мяты, герани, ириса, руты, лаванды, розы, полыни, аниса, шалфея, тысячелистника, розмарина, базилика, укропа, петрушки, ромашки и др. [6, 65, 110, 178, 182, 231, 265, 267, 272, 298, 333, 340, 348]. При этом в отдельных исследованиях указывалось на необходимость для синтеза эфирного масла достаточно высокого уровня дифференциации каллусных тканей и образования характерных для целого растения экскреторных элементов (идиобластов, железистых волосков, эфиромасличных вместилищ) [97, 272, 283, 348, 541]. В работе И.Н. Кузовкиной с соавторами показана тесная зависимость между образованием эфирного масла у руты душистой и формированием в каллусе всех трех типов секреторных образований, свойственных растению [110]. В каллусных культурах *Smyrniium perfoliatum* обнаружили  $\alpha$ -pinen, который продуцировался в секреторных структурах, формирующихся в верхнем слое каллуса [577]. У тысячелистника при анализе клеток суспензионных культур показано, что при синтезе монотерпенов часть секреторных характеристик клеток *in vivo* проявлялась *in vitro* [340]. Однако у мяты, розы, ириса, ромашки и полыни образование компонентов эфирного масла происходило и в недифференцированных культурах [6, 100, 178, 182, 272].

Известны единичные случаи, когда изолированные клетки сохраняли способность к синтезу эфирных масел, приближающихся по составу к маслу целого растения, чаще наблюдался синтез лишь отдельных или неспецифических для растения компонентов [65]. Во многих публикациях отмечали значительное снижение содержания эфирного масла и изменение его состава по сравнению с интактными растениями [65, 97, 178, 182, 267, 541]. Тем не менее, в отдельных случаях в условиях культуры наблюдался биосинтез эфирного масла на уровне, сравнимом с растением. В исследованиях D.V. Vanthorpe с соавторами установлено, что каллусы розмарина, укропа, пижмы и базилика не синтезировали терпеноиды, у жасмина некоторые монотерпены содержались на уровне 0,1% от их количества в лепестках, тогда как в каллусе сосны выявлено накопление  $\alpha$ - и  $\beta$ -пиненов на уровне растения [263]. У аниса изучены особенности накопления эфирного масла и его отдельных компонентов с использованием эмбриогенных каллусов, стеблевых культур и культуры бородачатых корней [249, 271, 518, 532]. Культура корней, полученная в результате агробактериальной трансформации, продуцировала эфирное масло в количествах,

сопоставимых с плодами, однако его состав отличался, в частности, не было основного компонента анетола [249, 532]. При исследовании у *Achillea millefolium* культуры бородачатых корней [435] и суспензионной культуры [340] также найдены количественные и качественные отличия эфирного масла по сравнению с растениями.

В исследованиях у герани показано наличие характерных для растения компонентов эфирного масла (линалоола, гераниола, цитронеллола) – в частности, в суспензии и иммобилизованных клетках *P. fragrans* [240, 283] и у выращиваемых в ферментере побегов *P. graveolens* [403]. При этом уровень биосинтеза *in vitro* был ниже, и состав монотерпенов часто отличался от растения. Так, J.T. Brown с соавторами отмечали, что накопление монотерпенов в суспензии составило 3% от их содержания в растении, из них 50% приходилось на лимонен [283].

Следует отметить работу D.V. Vanthorpe с соавторами, в которой при исследовании биосинтеза эфирного масла *in vitro* у *Lavandula angustifolia* обнаружено накопление в каллусе моно- и сесквитерпеноидов на уровне 20% от растения [267]. Изучая культуру пролиферирующих побегов *L. latifolia*, M.C. Calvo и M. Sánchez-Gras выявили накопление монотерпенов, сходных с донорными растениями, и показали, что накопление компонентов эфирного масла можно повысить при осмотическом стрессе или добавлении в среду АБК [289].

Имеются довольно противоречивые литературные данные, касающиеся синтеза эфирного масла у шалфея *in vitro* [65]. Так, в суспензионных культурах *Salvia officinalis* K.L. Falk с соавторами не выявили монотерпенов, хотя отметили наличие ферментов, необходимых для их синтеза [334]. Более успешными были работы с использованием культуры пролиферирующих побегов *S. officinalis*, в которых сообщалось о получении эфирного масла, содержащего до 75 компонентов [533].

В клеточных культурах многих эфиромасличных растений, наряду с эфирными маслами, были обнаружены и другие ценные вещества вторичного метаболизма [65]. Так, у аниса в изолированных культурах выявлены фенольные соединения, накопление которых зависело от дифференциации, и было ниже в эмбрионных и стеблевых культурах, чем в культуре бородачатых корней [249]. В некоторых работах у кориандра указывалось на синтез жирных кислот в культуре *in vitro*, в частности, петроселиновой кислоты [433]. В изолированных культурах шалфея обнаружены многие ценные соединения: дитерпеноид склареол у *S. sclarea* [266], урсоловая кислота у *S. officinalis* [612], некоторые

фенольные соединения (розмариновая кислота, карнозол, карнозоловая кислота) у *S. officinalis*, *S. chamelaeagnea*, *S. miltiorrhiza*, *S. fruticosa* [302, 231, 362, 377, 399, 495, 525, 534]. Так, P.C. Santos-Gomes с соавторами в каллусе, суспензионной и стеблевой культуре *S. officinalis* выявили 17 фенольных соединений, накопление которых зависело от гормонального состава питательной среды [534]. Польские ученые при анализе накопления фенольных соединений у *S. officinalis* показали, что их синтез зависел от уровня дифференциации – в каллусе и суспензионной культуре было очень низкое содержание карнозола, а карнозоловая кислота отсутствовала, тогда как в стеблях *in vitro* эти вещества накапливались почти на уровне растений [361, 362]. Представляют интерес работы по изучению культуры генетически трансформированных бородачатых корней *S. sclarea*, в которой были выявлены 4 дитерпеноида в концентрациях выше, чем в корнях растений, хотя их соотношение и отличалось от растений [426, 524]. У *Origanum majorana* при культивировании в жидкой среде корней или побегов, а также в каллусах были обнаружены фенольные соединения (кофейная, розмариновая и хлорогеновая кислоты), содержание которых зависело от типа культуры и состава питательной среды [414]. В некоторых вариантах эксперимента содержание суммы фенольных кислот в культуре корней и побегов *in vitro* было в 5-7,5 раз выше, чем в побегах полевых растений.

Каллусные и суспензионные культуры отдельных видов лаванды активно использовались для изучения накопления фенольных кислот (розмариновой, кофеиновой, феруловой и других) [350, 384, 498], пигментов [474, 580, 597], витамина биотина [416, 596], эфирного масла [542]. В работах болгарских ученых при выращивании суспензионной культуры *L. vera* установлено влияние на синтез розмариновой кислоты различных компонентов питательной среды [350, 384, 498] и температуры [349], что в дальнейшем позволило оптимизировать условия культивирования в лабораторном биореакторе [350, 498]. Представляет интерес также исследование биосинтеза биотина в клеточных культурах *L. vera*, проведенное К. Watanabe с соавторами, в котором при использовании  $\gamma$ -облучения и клеточной селекции получены клеточные линии, продуцирующие биотин в 7 раз больше, чем в исходных штаммах, и в 4,5 раз больше, чем в листьях растений [596].

Что же касается других биотехнологий, то данные о таких исследованиях у эфиромасличных растений довольно немногочисленны.

Следует упомянуть работы по криосохранению соматических эмбриоидов кориандра [506] и каллусов лаванды [424], исследованиях по культивированию протопластов и регенерации из них растений у фенхеля и герани (*P. aridum*, *P. hortorum*, *P. peltatum*) [478, 484]. Имеются сведения о получении *in vitro* гаплоидов герани [578], образовании каллуса и эмбриоидов из микроспор в культуре пыльников фенхеля [484], а также об индукции андрогенеза в культуре пыльников у кориандра, лаванды и шалфея [22, 53]. В частности, при исследовании культуры пыльников кориандра показана важная роль в индукции андрогенеза *in vitro* холодной предобработки, стадии микроспорогенеза, генотипа, состава питательной среды, условий выращивания исходных растений и двухэтапного культивирования [53]. В ФГБУН «НИИСХ Крыма» проведены исследования по использованию культуры изолированных зародышей для преодоления постгамной несовместимости при отдаленной гибридизации у розы эфиромасличной, шалфея и фенхеля [170, 180, 188, 200]. Имеются данные об индукции полиплоидии *in vitro* с применением колхицина или антимиотрубочковых соединений у видов шалфея [321], лаванды [552], котовника [85], монарды [460]. Исследования по клеточной селекции ограничиваются несколькими работами. В частности, это получение биотин-синтезирующих клеточных линий *Lavandula vera* [596], изучение действия NaCl на рост каллуса лавандина [553]. Для *Thymus vulgaris* подобраны концентрации NaCl в питательной среде, обеспечивающие пролиферацию каллуса и регенерацию из него растений [242]. Проведены исследования по клеточной селекции герани для получения форм, устойчивых к пятнистости листьев [539]. В последние годы активно разрабатываются методики длительного депонирования *in vitro* для розы эфиромасличной, лаванды, мяты и некоторых других эфиромасличных растений [66, 138, 155].

Имеются сообщения об исследованиях по генетической инженерии у мяты, лаванды, герани, шалфея, кориандра и других эфиромасличных растений [319, 421, 468, 479]. Так, у кориандра путем агробактериальной трансформации были получены трансгенные растения, которые использовались для изучения влияния на старение тканей гена, перенесенного из *Arabidopsis* [595]. G. Saxena с соавторами, используя трансформацию с помощью *Agrobacterium rhizogenes*, получили растения *Pelargonium graveolens*, у которых наблюдали вариации некоторых морфологических признаков, а также изменение состава эфирного масла

[536]. Китайские исследователи получили трансгенные растения *Salvia miltiorrhiza* с перенесенным из пшеницы геном TaLEA1, которые показали лучший рост на средах с добавлением 1% NaCl и 8% ПЭГ-6000, на основании чего авторы сделали вывод о важной роли этого гена в повышении соле- и засухоустойчивости шалфея [431]. Необходимо обратить внимание на интересные работы по генетической трансформации у лаванды [319, 479]. S. Dronne с соавторами разработали методику агробактериальной трансформации для лавандина, на основе которой было получено 41 трансгенное растение. Авторы предполагали использовать данный подход для модификации некоторых генетических признаков, а также изучения биосинтеза монотерпеновых компонентов эфирного масла [319]. Испанские ученые получили трансгенные растения *L. latifolia*, экспрессирующие перенесенный из арабидопсиса ген DXS, который кодирует один из первых этапов пути биосинтеза монотерпенов из предшественников [468]. Генетически модифицированные растения не отличались от контрольных по морфологии и росту, однако они накапливали в 2-3,5 раза больше эфирного масла, содержащего те же компоненты, что и исходные растения.

Таким образом, в имеющихся публикациях показаны широкие возможности биотехнологических методов в решении сложных вопросов, стоящих в настоящее время перед селекцией. Эти клеточные технологии активно используются у основных сельскохозяйственных культур, однако у эфиромасличных растений, судя по доступным данным, они большей частью находятся в стадии разработки. Для многих эфиромасличных культур полученные результаты касались в большей мере способов регенерации, микроразмножения или биосинтеза вторичных метаболитов *in vitro*. Интенсификация селекции этих растений возможна в значительной степени с внедрением новых экспериментальных подходов, таких как индукция соматической изменчивости, мутагенез *in vitro*, клеточная селекция и других, которые фактически для них не разработаны. Такие приемы могут способствовать получению ценного исходного материала с повышенной урожайностью, устойчивостью к засухе, низким температурам, болезням и другим стрессовым факторам среды.

Основой таких биотехнологий, прежде всего, является стабильная регенерация растений в культуре изолированных отранов и тканей *in vitro*. Для основных возделываемых и перспективных для России эфиромасличных культур (кориандра, шалфея, лаванды, фенхеля, аниса,

розы, тысячелистника, герани), данные о биотехнологических исследованиях весьма фрагментарны, а по многим клеточным технологиям отсутствуют. В доступных литературных источниках чаще всего описаны биотехнологические приемы у некоторых видов и сортов, не выращиваемых в России. Помимо этого, сведения о гормональном составе питательных сред, типах эксплантов и методиках регенерации порой очень противоречивы, а факторы, влияющие на процессы индукции каллусо- и морфогенеза, исследованы не в полной мере. Остаются открытыми вопросы влияния многих стрессовых факторов на развитие изолированных культур эфиромасличных растений, что затрудняет разработку методов клеточной селекции. Довольно противоречивы и немногочисленные сведения о степени изменчивости полученных регенерантов этих видов. Отсутствие единых методических подходов и недостаточность знаний о механизмах морфогенеза *in vitro* осложняют и ограничивают применение биотехнологических методов при работе с новыми видами или сортами. Все это послужило предпосылкой для проведения исследований по различным направлениям клеточной инженерии, изложенным в следующих главах.

## ГЛАВА 2

### ЛАВАНДА УЗКОЛИСТНАЯ (*LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* MILL.)

Лаванда узколистная (*Lavandula angustifolia* Mill.) относится к роду *Lavandula* L. семейства Яснотковые (Lamiaceae Mart.) [21]. Из большого разнообразия видов этого рода в эфиромасличном производстве используется в основном лаванда узколистная или обыкновенная (*L. angustifolia* Mill., *L. vera* DC.) [123, 164]. Лаванда является одним из основных возделываемых на юге России эфиромасличных растений [135]. Широкое применение этого растения связано с наличием в его соцветиях эфирного масла, кумаринов, дубильных и других веществ [371, 483, 558]. Лаванда возделывается главным образом для получения эфирного масла, основными компонентами которого являются линалилацетат (30-50%) и линалоол (10-20%), а также содержатся гераниол, нерол, лимонен, фурфурол и другие компоненты. Эфирное масло используется в пищевой и парфюмерно-косметической промышленности, в керамическом, лакокрасочном, фарфоровом производствах [151, 123]. В медицине его применяют как противомикробное, ранозаживляющее, антиоксидантное, успокаивающее и спазмолитическое средство, рекомендуемое при ревматических, желудочных и многих других заболеваниях [165, 483]. Лаванда используется как медоносное, декоративное, а также противоэрозийное растение, возделываемое на склоновых землях.

Лаванда узколистная представляет собой многолетний сильно ветвистый полукустарник высотой 60-70 и диаметром 60-80 см, который растет на одном месте 15-18 лет [135]. Куст состоит из множества (400-1000) отходящих от укороченного стволика побегов. Ежегодно весной от верхушек старых побегов вырастают цветоносные побеги, которые заканчиваются колосовидными соцветиями. Листья супротивные, сидячие, линейные или ланцетно-линейные, и имеют длину 4-6 см. Цветки мелкие, сидячие, собраны в мутовки, которые располагаются супротивно в колосовидном соцветии. Венчик трубчатый, двугубый с окраской, варьирующей от белой до темно-фиолетовой. На поверхности чашечки находятся эфиромасличные железки. Лаванда довольно холодостойкая культура, но с увеличением возраста ее устойчивость к низким температурам снижается и в холодные зимы может наблюдаться подмерзание растений. Благодаря наличию мощной корневой системы и волосков на листьях, лаванда хорошо переносит

засуху. Однако она лучше растет и развивается на почвах, хорошо обеспеченных влагой, особенно в критические периоды от начала вегетации до конца цветения и во время формирования летне-осеннего прироста.

Для интенсификации эфиромасличной отрасли необходимо получение новых высокопродуктивных и пластичных сортов лаванды, которое может быть успешным при создании достаточно разнообразного исходного селекционного материала, что в настоящее время возможно с привлечением современных методов биотехнологии.

Литературные данные по культуре изолированных органов и тканей различных видов рода *Lavandula* в основном касаются вопросов клонального микроразмножения и получения оздоровленного посадочного материала [141, 250, 303, 315, 327, 353, 370, 411, 430, 453, 455, 464, 555], индукции каллусо- и морфогенеза [152, 287, 481, 353, 384, 410, 492, 585, 600, 613], а также получения некоторых вторичных метаболитов – розмариновой кислоты [350, 355, 383, 498] и других фенольных кислот [384], а также пигментов [474, 580, 597], биотина [596] и терпеноидов [267, 358]. При этом ряд факторов, влияющих на процессы морфогенеза в изолированных культурах, затронут весьма фрагментарно и лишь у отдельных генотипов, а многие клеточные технологии у лаванды практически не разработаны (в частности, клеточная селекция, мутагенез *in vitro*). Существенной проблемой является также и то, что в этих работах, не изучали возделываемые в России сорта *L. angustifolia*. Все это послужило основанием для проведения исследований изолированных органов и тканей ряда сортов и образцов лаванды с целью разработки комплексной биотехнологической системы создания и ускоренного размножения новых селекционных форм. В экспериментах использовали сорта Степная, Синева, Ранняя, Вдала, Крымчанка, Галлея [135, 164] и селекционные образцы №№ 310-17, 58-1, 75-11, 61-1. Первые 4 сорта включены в «Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию» РФ [39].

## **2.1 Особенности индукции и длительного субкультивирования каллуса и влияния различных факторов на эти процессы**

Первым этапом разработки многих клеточных технологий является оптимизация условий получения и длительного выращивания каллусных культур. Проведенные исследования показали, что у

изученных генотипов лаванды при использовании различных эксплантов (лист, стебель, цветок) на питательных средах происходила индукция каллусогенеза. Формирующийся каллус был преимущественно рыхлый, мягкий, оводненный, светло-бежевого цвета или почти бесцветный (рис. 5.1). Частота образования каллуса была в 1,3-1,7 раз выше при использовании эксплантов листа, поэтому в дальнейшем исследовали в основном каллусную ткань листового происхождения.

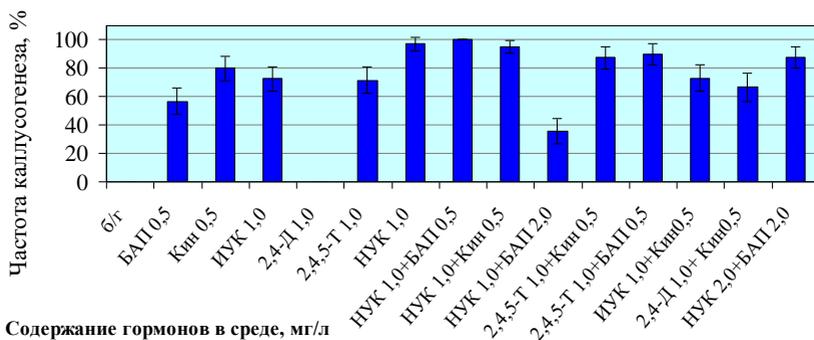


**Рис. 2.1** Калусные культуры, полученные из эксплантов листа (А) и длительно культивируемые каллусы лаванды сорта Степная (Б)

Установлено, что каллусообразование происходило при культивировании эксплантов на достаточно широком спектре модификаций питательной среды МС (рис. 2.2). Высокую частоту индукции каллуса (более 70-80%) у сорта Степная обеспечивало добавление НУК или совместное введение в среду одного из ауксинов (НУК, 2,4,5-Т, ИУК) и цитокининов (БАП, Кин). При этом максимальная частота каллусогенеза (до 100%) отмечена на среде МС160, содержащей 1,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП. Введение в среду одного цитокинина или значительное преобладание содержания цитокинина над ауксином вызывало снижение в 1,3-1,6 раз частоты индукции каллуса. Культивирование сегментов листа на безгормональной среде или в присутствии 2,4-Д приводило к ингибированию каллусогенеза. Аналогичные закономерности действия гормонального состава среды выявлены и у других сортов лаванды, поэтому для получения каллусных культур у них также использовали среду МС160.

В литературе имеются достаточно противоречивые сведения о составе питательных сред для каллусогенеза лаванды. Оптимальной средой для индукции каллуса из листьев у *L. angustifolia* по одним

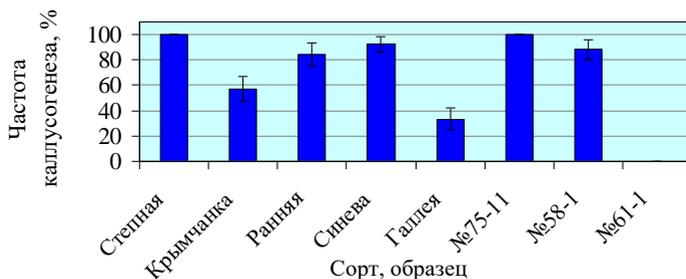
данным была среда МС с добавлением БАП и ГК<sub>3</sub> [353], а по другим – МС с 2,4-Д, ИУК и Кин [20]. В ряде работ для каллусогенеза у *L. vera*, *L. spica* и лавандина, наряду с цитокининами, использовали 2,4-Д [384, 410, 492, 600]. Для изученных нами сортов *L. angustifolia*, вопреки многим из этих сообщений, 2,4-Д отрицательно действовала на рост каллусной культуры, а оптимальная модификация среды, обеспечившая получение и длительное культивирование листового каллуса, содержала 1,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП.



**Рис. 2.2** Влияние гормонального состава питательной среды на индукцию каллусогенеза из эксплантов листа лаванды сорта **Степная**

Исследовано влияние времени года, когда проводилось введение в культуру *in vitro*, на способность листовых эксплантов лаванды к индукции каллуса. В течение 5 лет анализировали одни и те же донорные растения, выращиваемые в условиях закрытого грунта. Установлено, что в летний период отмечалась наименьшая способность к образованию каллуса. У трех изученных сортов (Степная, Синевя, Вдала) в летние месяцы частота каллусогенеза была в 2,0-2,5 раза ниже, чем в остальные. Так, у сорта Степная при введении эксплантов в культуру *in vitro* частота каллусогенеза зимой, весной и осенью колебалась от 85,4 до 100,0%, тогда как в летний период не превышала 48,5%. Максимальная частота каллусогенеза весной и осенью может быть связана с активным отрастанием побегов и изменением уровня эндогенных фитогормонов. Учитывая полученные данные, в дальнейшем введение в культуру проводили в основном в эти сезоны.

Показано, что на индукцию каллусогенеза значительное влияние оказывали генотипические особенности (рис. 2.3). Максимальная частота формирования каллуса из эксплантов листьев (100%) отмечена у сорта Степная и образца №75-11. У большинства других изученных генотипов частота каллусогенеза была достаточно высокой, варьируя от 57,1 до 90,0%. Низкая частота каллусообразования (до 33,3%) характерна для сорта Галлея. У селекционного образца № 61-1 на испытанных модификациях сред каллус не формировался, лишь изредка наблюдали начальные этапы пролиферации по краям листа.



**Рис. 2.3 Влияние генотипа на частоту индукции образования каллуса из листовых эксплантов лаванды**

Важную роль в каллусообразовании играет физиологическое состояние донорного растения, а также расположение экспланта как на растении, так и на питательной среде [26, 94]. В наших экспериментах показано влияние на частоту формирования каллуса лаванды ориентации листового экспланта на поверхности среды (табл. 2.1). Частота каллусообразования на всех изученных средах при помещении листа адаксиальной стороной на агар была в 1,5-2,0 раза выше по сравнению с абаксиальной стороной, при этом формировался каллус большего объема. Выявленная разница пролиферативной активности в зависимости от расположения экспланта может быть связана с анатомо-морфологическими особенностями строения листовой пластинки, а возможно, и физиологической полярностью, обусловленной градиентом эндогенных физиологически активных веществ. В некоторых работах также показана важная роль ориентации экспланта в индукции каллусо- или морфогенеза [50, 364, 394], и, в частности, преимущество их адаксиального помещения на среду [138].

**Таблица 2.1 Влияние ориентации листовых эксплантов на питательной среде на частоту индукции каллуса у лаванды сорта Степная (%)**

Гормональные добавки в питательной среде МС, мг/л	Расположение эксплантов на питательной среде	
	адаксиально	абаксиально
НУК(1,0)+БАП(0,5)	91,3±7,1*	61,9±4,5
2,4,5-Т(2,0)+ Кин(1,0)	83,3±5,7*	47,8±4,0
ИУК(1,0)+Кин(0,1)	45,6±2,2*	30,4±2,5
НУК(1,0)+БАП(2,0)	50,0±4,3*	25,0±1,5
ИУК(1,0)+БАП(4,0)	85,7±7,5*	51,2±4,4
НУК(1,0)+БАП(2,0)+АБК(1,0)	77,7±5,9*	54,5±4,6

\*Различия адаксиального и абаксиального положения достоверны при  $p \leq 0,05$

Одним из необходимых этапов работ по культуре тканей растений является оптимизация условий культивирования для длительного пассирования каллуса, поскольку питательные среды и условия для его индукции и субкультивирования могут отличаться [11, 112, 126]. На основании изучения влияния 28 модификаций среды МС на интенсивность прироста каллуса второго пассажа сорта Степная установлено, что оптимальной для длительного выращивания являлась та же среда, что и для индукции каллусогенеза – МС160. Показано, что при культивировании в течение нескольких лет каллуса лаванды сорта Степная эта среда обеспечивала более высокий прирост биомассы по сравнению со средами МС, содержащими только НУК или НУК в сочетании с Кин. Ростовый индекс на среде МС160 был достаточно стабилен первые восемь пассажей (17,8-19,2) [71]. При дальнейшем культивировании, вплоть до 28-го пассажа, наблюдали небольшое увеличение этого параметра до 21,5-22,0 [71], что может быть связано с автоселекцией интенсивно растущих клеточных линий. У других сортов (Синева, Вдала, Ранняя) среда МС160 также обеспечивала интенсивный рост каллуса при длительном культивировании – ростовые индексы были не менее 15-17. При пассировании в течение 2-3 лет на этой среде развивался рыхлый светло-бежевый каллус, иногда со светло-зелеными участками (см. рис. 2.1).

Одним из факторов, влияющих на рост каллусных культур, является масса транспланта. На это указывается в некоторых работах, однако имеющиеся данные довольно противоречивы, что может быть

обусловлено как видовыми особенностями, так и разными условиями культивирования в этих экспериментах [366, 387]. В наших исследованиях установлено, что у лаванды по мере увеличения массы транспланта прирост каллуса снижался. Максимальный РИ 27,3 характерен для меньшего транспланта массой 35,2 мг, а минимальный (7,4) – для наиболее крупного транспланта массой 309,8 мг (табл. 2.2). Несмотря на максимальный РИ, каллусы массой 35 мг имели в конце цикла выращивания незначительный прирост биомассы (959,8 мг), что не очень подходит для наработки достаточного объема каллусной ткани. Поэтому в дальнейшем для пассирования использовали каллусные транспланты массой около 100 мг, которые обеспечивали почти 15-кратный прирост при достаточно высокой массе в конце цикла выращивания (1533,9 мг) и, вместе с тем, были более удобны для манипуляций при субкультивировании.

**Таблица 2.2 Влияние массы транспланта на прирост массы каллуса лаванды сорта Степная в цикле выращивания**

Масса транспланта, мг	Масса каллуса в конце пассажа, мг	Ростовой индекс
35,2±1,3	959,8±28,8	27,3±0,8
104,8±3,5	1533,9±68,1	14,6±0,6
199,4±2,5	2261,7±24,9	11,3±0,2
309,8±4,8	2292,3±39,6	7,4±0,1

Довольно важным вопросом при разработке методов клеточной инженерии, является определение оптимального количества трансплантов в культуральном сосуде. Проанализировано три варианта – в колбу (с 30 мл среды) помещали по 1, 3 и 6 трансплантов (каждый массой 100 мг). Установлено, что количество каллусов лаванды в значительной степени определяло интенсивность их роста (табл. 2.3). Максимальный РИ каллуса (49,7) отмечен при культивировании в колбе одного транспланта. При увеличении количества каллусов в колбе до трех или шести штук РИ снижался в 2 и 3 раза соответственно. По-видимому, снижение интенсивности прироста каллусных культур при увеличении числа трансплантов в колбе связано с возрастающей конкуренцией пролиферирующих тканей за питательные вещества, а возможно и накоплением в среде метаболитов, отрицательно влияющих на их рост.

**Таблица 2.3 Влияние количества трансплантов в колбе на прирост массы каллуса лаванды сорта Степная в цикле выращивания**

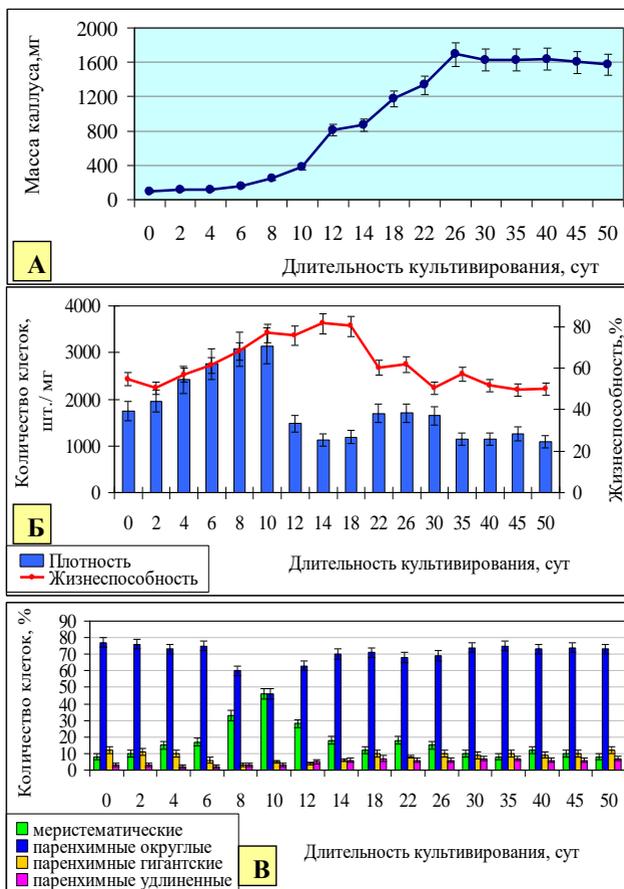
Количество трансплантов в колбе	Масса каллуса в конце цикла выращивания, мг	Ростовой индекс каллуса	Масса каллуса/ на колбу, мг
1	4909,1±199,6	49,7±2,1	4909,1
3	2345,6±105,6	23,1±1,1	7036,8
6	1606,3±52,5	15,0±0,5	9637,8

Показано, что у изучаемых сортов лаванды не было достоверных различий по приросту массы каллуса при различных вариантах освещения (без освещения; освещение 600 лк и 2-3 клк с 16-часовым фотопериодом). Например, у сорта Степная ростовые индексы при таких режимах были соответственно 17,1±0,7; 19,3±0,8; 18,2±0,8. Это свидетельствует о возможности использования для культивирования каллусных культур более экономного режима без освещения.

## **2.2. Характеристика популяции каллусных клеток лаванды по цитофизиологическим параметрам и содержанию ДНК**

Важное значение при изучении особенностей длительно культивируемых каллусных тканей имеет анализ цитофизиологических характеристик в цикле выращивания, который был проведен на примере каллуса лаванды сорта Степная листового происхождения 7 пассажа (рис. 2.4) [55]. Показано, что за цикл выращивания происходило почти 18-кратное увеличение сырой массы каллуса. При этом первые 2-3 суток после пересадки на свежую питательную среду масса каллуса и его плотность достоверно не менялись, что соответствует латентной фазе ростового цикла. В этот период адаптации клеточной популяции отмечено незначительное снижение жизнеспособности клеток до 50%.

Экспоненциальная фаза роста начиналась на 4-6-е сут, когда отмечали достоверное повышение массы и плотности каллуса. Как следствие интенсивных делений в этот период увеличивалось число меристематических клеток, и повышалась жизнеспособности клеточной популяции до 80-81%. Максимальную плотность каллуса ( $3145 \times 10^4$  клеток/мг) и число клеток меристематического типа (45%) отмечали на 10-е сут культивирования [71]. Переход популяции в линейную фазу, характеризующуюся наиболее активным ростом, начинался с 10-12-х сут, когда прирост массы происходил в основном за счет роста клеток растяжением, при этом снижалось число меристематических клеток и плотность каллуса.



**Рис. 2.4** Динамика изменения массы каллуса (А), плотности и жизнеспособности клеточной популяции (Б) и соотношения различных типов клеток (В) в цикле выращивания каллуса лаванды сорта Степная

В конце линейной фазы, на 22-е сутки цикла выращивания отмечено еще одно повышение плотности и числа меристематических клеток, что, по-видимому, отражает еще один, более слабый, пик митотической активности клеточной популяции. Переход популяции каллусных клеток в стационарную фазу начинался, судя по динамике изменения массы каллуса, примерно на 26-е сутки культивирования.

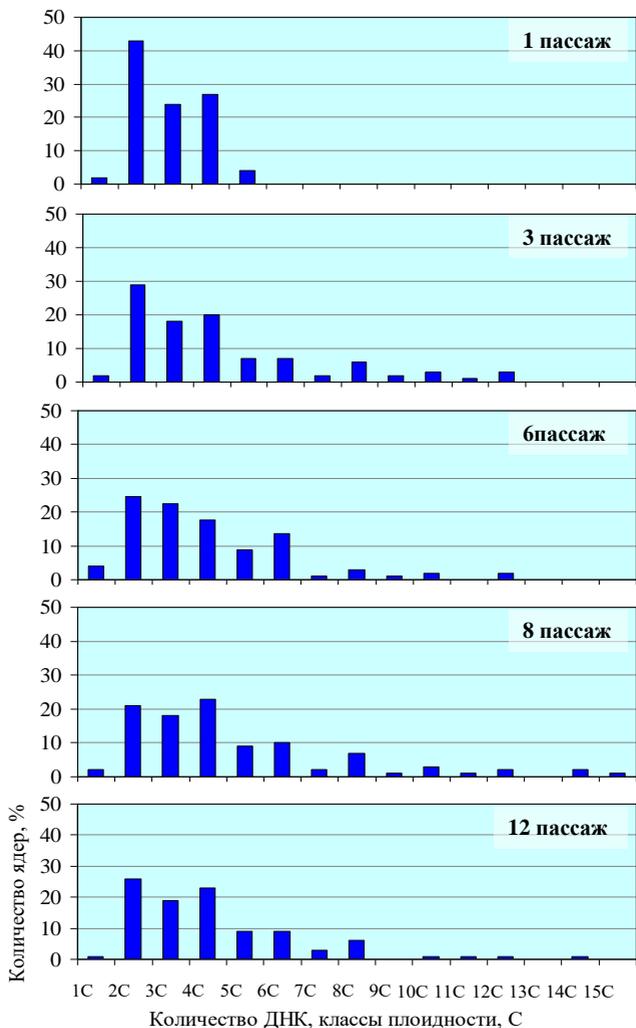
В этот период прекращался достоверный прирост массы, стабилизировались плотность каллуса и число клеток разного типа, и начиналось снижение жизнеспособности популяции (см. рис. 2.4).

Выявленная продолжительность фаз ростового цикла, в частности, наступление стационарной, позволяет установить оптимальную длительность цикла выращивания каллуса лаванды, который у этого вида должен быть в пределах 35-40 суток. Кроме того, необходимо учитывать фазы роста при проведении мутагенных обработок, а также в клеточной селекции, когда важно знать общее состояние клеточной популяции. Литературные данные свидетельствуют о высокой видовой специфичности прохождения фаз ростового цикла, а также их зависимости от условий культивирования, что было продемонстрировано для ряда лекарственных растений, у которых наступление стационарной фазы варьировало от 17 до 60-70 суток цикла выращивания [112].

Одним из важных вопросов, касающихся исследований формирования и функционирования клеточной популяции в изолированной культуре, а также получения соматклонов, является изучение изменчивости культивируемых каллусных клеток по числу хромосом или содержанию ДНК. Имеется довольно много работ, свидетельствующих о вариабельности хромосомных чисел соматических клеток *in vitro*, в зависимости от генотипа, пассажа, экспланта, условий культивирования и других факторов [71, 112, 134, 226].

Для изучения культивируемых клеток *L. angustifolia* применили метод количественной цитохимии, который позволяет анализировать не только делящиеся клетки, но и всю популяцию жизнеспособных клеток, а также может косвенно свидетельствовать об изменении их плоидности. При люминесцентном цитохимическом анализе для количественного определения ДНК в интерфазных ядрах цитологические препараты каллусов окрашивали оливомицином [18]. Содержание ДНК в ядрах определяли по интенсивности флуоресценции комплекса ДНК-оливомицин на цитофлуориметре [71]. Содержание ДНК выражали в условных единицах или классах плоидности – С. Для анализа использовали каллусный штамм лаванды листового происхождения сорта Степная на стационарной фазе цикла выращивания [71]. Как видно из полученных данных, в каллусе первого пассажа наблюдали в основном клетки, содержащие в интерфазных

ядрах от 2С до 4С ДНК (рис. 2.5). Наличие в популяции ядер, содержащих 3-4С ДНК, может свидетельствовать не столько о полиплоидизации, сколько о нахождении культивируемых клеток в синтетическом (S) или постсинтетическом ( $G_2$ ) периодах клеточного цикла.



**Рис. 2.5** Динамика изменения содержания ДНК в каллусных культурах разных пассажей у лаванды сорта Степная

В 3 и 6-м пассажах появлялось до 30% клеток, содержащих от 5С до 12С ДНК, что является следствием их полиплоидизации, а возможно, и эндорепродукции. В 8-м пассаже наблюдали еще большую гетерогенность популяции клеток – появлялось больше клеток с увеличенным содержанием ДНК, вплоть до 14-15С ДНК. Однако в 12-м пассаже количество клеток с содержанием ДНК более 4С снизилось. Клетки, содержащие более 8С ДНК, составили всего 4% популяции, что свидетельствует об уменьшении уровня изменчивости. Значительная часть популяции в этот период представлена клетками, содержащими 2С ДНК.

У многих видов растений при анализе содержания ДНК в каллусах указывалось на значительный уровень варибельности по этому показателю [22, 112, 295, 391]. При сравнении полученных нами результатов с некоторыми изученными эфиромасличными растениями обращает внимание меньший уровень изменчивости каллусных клеток у лаванды. Так, в каллусе герани в 6-м пассаже обнаруживались клетки с уровнем ДНК до 16-32С ДНК, а у фенхеля такие клетки появлялись уже во 2-м пассаже [22]. У лаванды во всех изученных пассажах модальный класс составляли клетки с 2С ДНК (за исключением 8-го пассажа, в котором он составил 4С ДНК), а общее число клеток с 2С-4С ДНК достигло 62-68% [71]. По мере субкультивирования гетерогенность клеток по содержанию ДНК увеличивалась, что в значительной степени может быть связано с увеличением количества хромосом. И хотя соматоклональная варибельность культивируемых клеток *in vitro* определяется не только изменением числа хромосом, но и хромосомными перестройками, мутациями генов и другими событиями [94, 191, 192], полученные данные однозначно свидетельствуют об увеличении генетической изменчивости по мере пассирования каллуса лаванды. При этом следует обратить внимание на то, что в более позднем 12-м пассаже обнаруживалась тенденция к снижению изменчивости содержания ДНК, что может быть обусловлено действием стабилизирующего отбора в клеточных популяциях в сформированном штамме. Для ряда видов растений получены данные о том, что в сформированных штаммах модальный класс составляли клетки с числом хромосом в пределах 2n-4n [112]. У лилии, герани и фенхеля также было показано, что нарастание гетерогенности популяции клеток по содержанию ДНК происходило до определенного пассажа. Затем этот процесс стабилизировался, и клетки, содержащие более 8С ДНК, не превышали 15% [22].

### 2.3 Изучение биосинтетической способности изолированных культур лаванды

Одним из перспективных биотехнологических направлений является изучение накопления вторичных метаболитов в культуре *in vitro*, и, в частности, различных пигментов [26, 112, 163, 305, 375, 396, 412]. Для некоторых видов лаванды (*L. spica*, *L. vera*) также имеются сообщения о способности изолированных культур синтезировать голубой пигмент [474, 580, 597].

В наших исследованиях при морфологическом анализе каллусов лаванды обнаружены единичные штаммы, которые синтезировали пигмент. Так, у сорта Степная выделен штамм L-804, характеризующийся способностью синтезировать голубой пигмент, не характерный для исходных листовых эксплантов. Этот штамм представлял собой рыхлый, оводненный, светло-бежевый каллус, состоящий преимущественно из округлых паренхимных клеток с единичными трахеидными элементами. Основным отличием штамма L-804 была способность выделять пигмент, вызывая появление в агаре окрашенной зоны от светло-голубого до синего цвета. При этом сам каллус оставался практически не окрашенным. Появление окраски обычно происходило через 10-15 суток после субкультивирования каллуса на свежую среду, что соответствовало поздней экспоненциальной фазе роста. При цитологическом анализе установлено, что голубой пигмент локализовался в межклеточном пространстве, преимущественно вокруг небольших агрегатов паренхимных клеток.

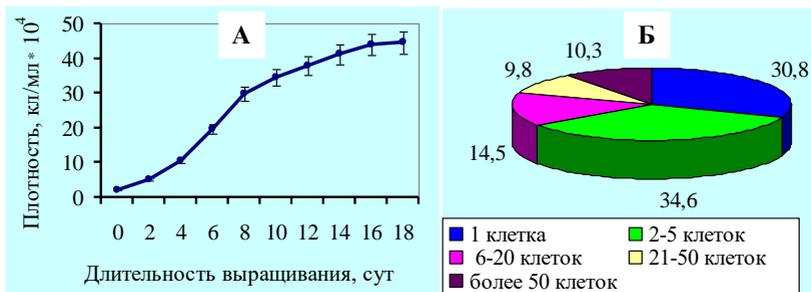
Культура клеточных суспензий является удобным объектом для многих биотехнологий и позволяет более эффективно выделять линии-продуценты вторичных метаболитов. Подобраны условия получения и длительного культивирования суспензионной культуры лаванды [78]. В частности, определена питательная среда (МС160), скорость вращения качалки (90 об/мин) и исходная плотность для субкультивирования суспензии ( $1,8-2,0 \times 10^4$  кл./мл). Такие режимы обеспечивали 22-кратный прирост плотности за 2 недели, жизнеспособность на уровне 72-77% и высокое содержание одноклеточной фракции (25-35%).

Установлено, что перевод каллусной ткани штамма L-804 в суспензионную культуру и выращивание на качалке (рис. 2.6) способствовали более активному выделению пигмента в жидкую среду по сравнению с агаризованной. Изучена динамика плотности, агрегированности (рис. 2.7) и жизнеспособности суспензии этого штамма,

которые не отличались от других штаммов сорта Степная. На основе этих параметров определена продолжительность основных фаз цикла выращивания – лаг-период составил всего сутки, экспоненциальная и линейная фазы роста отмечались на 4 и 8-е сут цикла выращивания. Переход популяции в стационарную фазу начинался в конце второй недели культивирования, поэтому оптимальной продолжительностью цикла выращивания суспензии является 14-18 сут.



**Рис. 2.6** Культивирование суспензионных культур штамма продуцента голубого пигмента лаванды (L-804) на качалке



**Рис. 2.7** Динамика изменения плотности клеточной популяции в цикле выращивания суспензионной культуры лаванды штамма L-804 (А) и агрегированность (%) на стационарной фазе роста (Б)

Показано, что максимальное окрашивание клеточной суспензии наблюдалось на 6-8-е сут культивирования, что совпадало с линейной фазой роста. В период стационарной фазы голубая окраска среды постепенно переходила в бурую. По имеющимся литературным данным,

у *L. vera* в суспензионной культуре наиболее активный синтез голубого пигмента наблюдался в первую неделю цикла выращивания [597], а при использовании иммобилизованных клеток максимальное накопление пигмента происходило на стационарной фазе роста через 2 недели после субкультивирования [474]. В этих работах установлено, что в суспензионной культуре, а также в иммобилизованных клетках штамма *L. vera*, выделенного как продуцент биотина, синтез голубого пигмента индуцировался добавлением в среду цистеина [474, 597]. Однако в нашем исследовании введение цистеина в питательную среду для культивирования штамма L-804 у *L. angustifolia* не способствовало усилению синтеза пигмента. По-видимому, был выделен мутантный штамм L-804, образующий голубой пигмент без присутствия в среде этой аминокислоты.

Достаточно эффективным методическим приемом, позволившим отбирать и поддерживать в течение нескольких лет продуктивные линии лаванды, явился плейтинг суспензионной культуры на агаризованную среду и последующий отбор продуктивных линий. Целесообразность проведения такого отбора обусловлена высокой гетерогенностью популяции растительных клеток *in vitro* по их способности к синтезу вторичных метаболитов [26, 97, 112, 153]. В наших исследованиях показано, что культивирование штамма L-804 в виде каллусной ткани без проведения таких отборов через 2-3 года приводило к ослаблению биосинтетической способности, в результате менее 20% трансплантов при субкультивировании выделяли пигмент. Поэтому суспензионную культуру этого штамма периодически платировали на агаризованную среду и после появления клеточных колоний отбирали более окрашенные, применяя приемы визуальной селекции. Проведение нескольких циклов таких отборов позволило в течение шести лет поддерживать биосинтетическую активность штамма L-804 и отобрать несколько линий с более интенсивной пигментацией.

В процессе биохимических исследований [57] выделенного из суспензионной культуры пигмента показано обратимое влияние рН среды на окраску спиртовых растворов пигмента. Спектрофотометрический анализ раствора пигмента (рН 4,0) позволил установить наличие абсорбционного минимума в области 460 нм, что является доказательством сходной природы исследуемого пигмента и пигмента, обнаруженного Н. Watanabe с соавторами в культуре клеток *L. vera* [597]. Результаты хроматографического разделения

свидетельствовали о том, что голубой пигмент суспензионной культуры лаванды являлся соединением сложного состава. В различных системах растворителей обнаружено три соединения с различными значениями Rf. В их числе – одно из соединений, имеющее желтую окраску пятна, идентифицировано как соединение фенольной природы, относящееся к группе флавонов. Химическую природу пигмента можно представить как комплексный (хелатный) металлсодержащий антоциан, в развитии и углублении окраски которого принимает участие желтый пигмент флавоновой природы [57]. На сложную природу образующихся в суспензии *L. vera* пигментов обращали внимание и Н. Nakajima с соавторами, которые показали, что при культивировании в темноте формировался коричневый пигмент, причем один из компонентов этого пигмента являлся предшественником голубого [474].

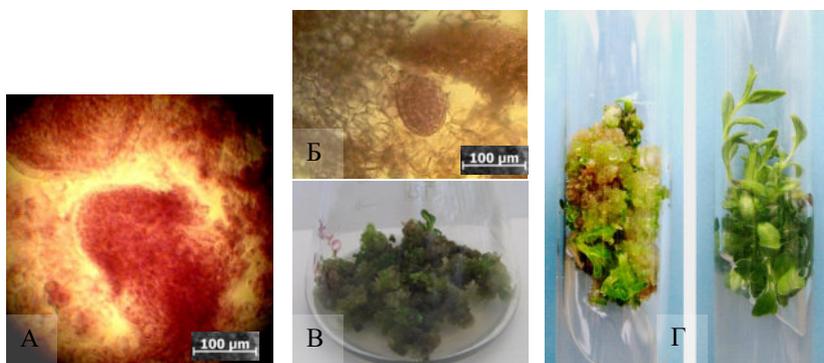
Выявленная способность клеточных культур лаванды к синтезу пигмента представляет не только теоретический интерес, но может послужить основой биотехнологии получения растительного красителя.

#### **2.4. Индукция морфогенеза в каллусной культуре и определение основных лимитирующих факторов**

Индукция морфогенеза в изолированных культурах у большинства видов растений является достаточно сложной проблемой, она нередко ограничена первыми пассажами и требует кропотливого подбора питательных сред, эксплантов и других экзогенных и эндогенных факторов. В работах ряда исследователей продемонстрирована возможность индукции морфогенеза и регенерации растений в каллусных культурах, полученных из листовых эксплантов у *L. vera* [410, 585], *L. spica* [600], *L. latifolia* [287], *L. angustifolia* [20], лавандина [318] и других видов [355, 389]. G. Ghiorghita с соавторами у *L. angustifolia* получили регенерацию в каллусах из сегментов междоузлий, участков стебля с узлом и листьев [353]. D. Leelavathi с соавторами сообщали об индукции морфогенеза из каллусов, полученных из верхушек побегов *L. angustifolia* [430]. Сравнение разных типов эксплантов у лавандина позволило М. Panizza и F. Tognoni выявить преимущество использования для индукции морфогенного каллуса сегментов стебля с узлом, по сравнению с листьями, верхушками побегов, бутонами и чашечками [492]. В некоторых исследованиях при получении способных к морфогенезу каллусных культур у разных генотипов лаванды были использованы гипокотили [286] или почки [152]. Однако, учитывая высокую генотипическую

зависимость процессов морфогенеза, часто необходимо разрабатывать протоколы регенерации для новых генотипов.

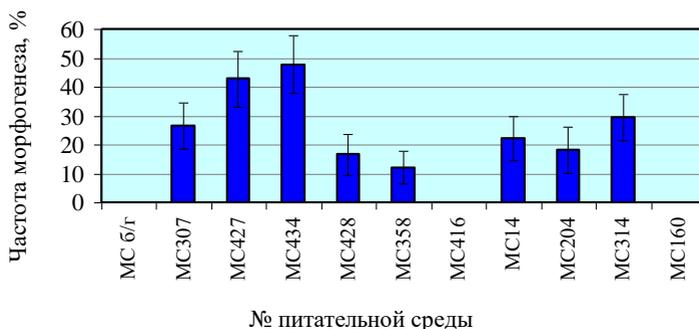
Для стимуляции морфогенеза каллусы листового происхождения переносили, начиная с первого пассажа, на питательные среды, содержащие цитокинины и ауксины (БАП, Кин, зеатин, НУК, ИУК, ИМК). На некоторых вариантах сред происходила индукция морфогенеза, при этом в светло-бежевом каллусе через 3-4 недели появлялись зеленые меристематические участки с почками, а через 6-8 недель развивались микропобеги (рис. 2.8). У основания некоторых микропобегов изредка формировался небольшой корешок. При цитологическом анализе среди массы каллусных клеток выявляли апексы с примордиями, а иногда – зародышеподобные структуры.



**Рис. 2.8 Индукция морфогенеза в каллусе лаванды: формирование апексов побегов (А), зародышеподобных структур (Б), развитие почек и побегов (В, Г)**

В ряде исследований при изучении морфогенеза показаны различные пути регенерации растений – соматический эмбриогенез у *L. vera* [410], или органогенез у *L. latifolia* и *L. stoechas* [286, 287]. В исследованиях В.М. Новиковой с соавт. в каллусных культурах лавандина и сорта Рекорд выявлено одновременное развитие почек и эмбриоидов, которое происходило на среде одного состава в течение 6-9 пассажей [152]. При регенерации в каллусных культурах лаванды некоторыми авторами было отмечено значительное влияние на индукцию морфогенеза генотипа и типа экспланта [1, 353, 492], а S. Kintzios с сотрудниками указывали на ключевую роль в этом процессе освещения [410].

В наших экспериментах установлено, что индукция морфогенеза у лаванды в значительной степени зависела от состава питательной среды и на безгормональной среде не происходила. Появление морфогенных очагов выявлено в основном на средах, дополненных БАП или Кин. Как видно из представленных на рис. 2.9 данных, наибольшая частота морфогенеза отмечалась в присутствии БАП. Повышение концентрации этого цитокинина с 0,5 до 1,0 мг/л вызывало увеличение количества каллусов с почками. Дальнейшее увеличение его содержания не способствовало достоверному повышению частоты морфогенеза. Введение в питательную среду 1-2 мг/л Кин было менее эффективно, а добавление зеатина угнетало пролиферацию каллуса. Совместное введение в среду БАП с кинетином (МС14) или БАП с НУК или ИУК (МС 204, 314) приводило к достоверному снижению частоты морфогенеза по сравнению со средой МС427.

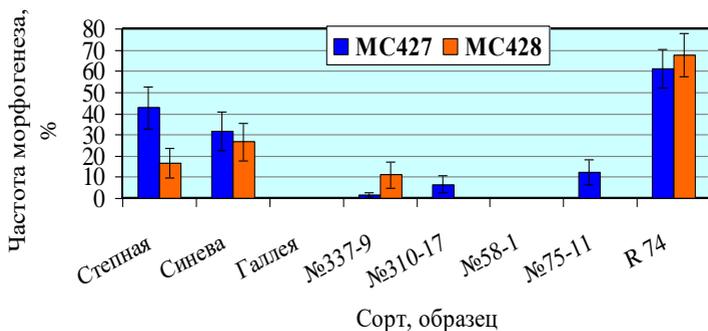


**Рис. 2.9** Влияние гормонального состава питательной среды на индукцию морфогенеза в каллусной культуре 1 пассажа лаванды сорта Стенная

Гормональные добавки в питательной среде МС (мг/л): МС б/г – без гормонов; МС307 – БАП (0,5); МС 427 – БАП (1,0); МС434 – БАП (2,0); МС428 – Кин (1,0); МС358 – Кин (2,0); МС416 – зеатин (1,0); МС14 – БАП (1,0)+ Кин (1,0); МС204 – БАП (2,0)+НУК (0,1); МС314 – БАП (2,0)+ИМК (0,5); МС160 – НУК (1,0)+БАП (1,0)

Некоторые исследователи также указывали на преимущество применения у лаванды в качестве индуктора морфогенеза БАП [318, 353, 492]. В то же время, в других работах для регенерации в каллусной культуре лаванды использовали тидиазурон [584], БАП совместно с НУК или ИУК [20, 287].

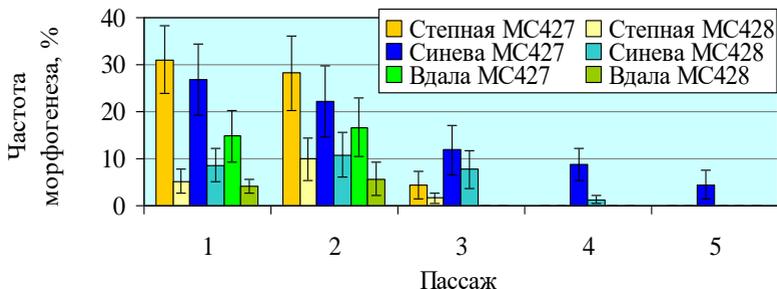
Проведенные исследования показали значительное влияние на индукцию морфогенеза генотипических особенностей. Из 8 изученных сортов и образцов лаванды формирование почек и побегов в каллусе было отмечено у ‘Степной’, ‘Синева’, № 75-11, № 337-9, № 310-17, R74 (рис. 2.10). Потребности в регуляторах роста для индукции морфогенеза зависели от генотипа. У сорта Степная лучшим индуктором морфогенеза оказался БАП; а у сорта Синева оба цитокинина (Кин и БАП) вызывали образование почек с достоверно не различавшейся частотой. В то же время у образцов № 75-11 и № 310-17 морфогенез наблюдали только на среде с БАП, а у № 337-9 – преимущественно на среде с Кин. Наибольшая частота морфогенеза была характерна для сорта Степная (47,8%), тогда как у селекционных образцов этот показатель не превышал 10-12% (см. рис. 2.10).



**Рис. 2.10** Влияние генотипа и питательной среды на индукцию морфогенеза в каллусной культуре лаванды 1-го пассажа

Исследовано влияние длительности культивирования каллуса на индукцию морфогенеза (рис. 2.11). Наибольшая частота морфогенеза отмечена в первом пассаже – у сортов Синева и Степная соответственно 26,8 и 31,0%. При последующем культивировании частота морфогенеза снижалась и наблюдалась у этих сортов только в течение 3-5-го пассажей. У сорта Вдала регенерация проходила с меньшей частотой (до 14,8%) и наблюдалась только в 1-2-м пассажах. Полученные данные о снижении частоты морфогенеза с увеличением длительности культивирования соответствуют общей для многих видов растений тенденции снижения морфогенетического потенциала по мере пассирования каллуса [26, 112, 221, 420, 480, 336, 554]. В большинстве исследований у лаванды не

уточнялась длительность субкультивирования каллусных тканей, или регенеранты получали из первичного каллуса [354, 430, 686]. Вместе с тем сообщалось о сохранении способности каллусов лавандина к индукции морфогенеза в течение года [221].



**Рис. 2.11** Влияние пассажа, сорта и состава питательной среды на индукцию морфогенеза в каллусной культуре лаванды

Полученные экспериментальные данные по индукции процесса морфогенеза в каллусной культуре лаванды, свидетельствуют о достоверном влиянии ряда факторов на этот процесс. Трехфакторный дисперсионный анализ показал, что наиболее существенную роль в индукции морфогенеза играли питательная среда и пассаж, доли влияния которых составили по 0,21. Существенное влияние оказывал генотип (0,18), а также взаимодействие генотип-питательная среда (0,11).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у лаванды индукция морфогенеза в каллусе листового происхождения не превышала 40-50% и, как правило, ограничивалась 3-5 пассажами. Такое снижение регенерационного потенциала в ходе субкультивирования может оказаться существенным ограничением при разработке некоторых клеточных технологий. Поэтому для повышения эффективности регенерации были исследованы некоторые методические приемы. Одним из таких подходов может быть использование штаммовых различий. Изучение различных каллусных штаммов показало, что среди них иногда выделялись штаммы, сохраняющие высокие регенерационные способности до 2-3 лет. Такие морфогенные штаммы можно использовать в различных клеточных технологиях для длительной регенерации проростков.

Установлено, что при использовании в качестве донорных растений регенерантов наблюдалось увеличение частоты морфогенеза.

В частности, у регенеранта R74 (полученного из листового каллуса сорта Степная) частота индукции морфогенеза была в несколько раз выше, чем у исходного сорта и достигала 67,7% (см. рис. 2.10). Необходимо отметить, что у регенеранта, в отличие от исходного сорта, индукция почек в каллусе происходила почти с одинаковой частотой на средах и с БАП и с Кин. Сходные данные о повышении регенерационной способности каллусных культур, полученных из регенерантов, по сравнению с исходными генотипами, были получены у подсолнечника и брокколи [4, 521].

Известно, что важную роль в определении морфогенного потенциала каллусных культур играет исходный эксплант. Основная часть наших исследований с каллусами лаванды проводилась при использовании листовых эксплантов, которые показали хорошую способность к каллусо- и морфогенезу. С целью повышения морфогенетических способностей каллусов лаванды, наряду с листьями, в качестве эксплантов были испытаны пазушные почки, изолированные из растений. У трех изученных сортов (Степная, Вдала, Синева) уже в первичном каллусе из почек на среде для индукции морфогенеза МС 427 наблюдали индукцию морфогенеза с частотой 4,5-9,6%, тогда как в листовой каллус был неморфогенным. В первом пассаже частота морфогенеза на этой среде в каллусе из почек достигала 53,8-82,4%, тогда как этот показатель у листового каллуса был в несколько раз ниже – от 5,7 до 23,7% (в зависимости от сорта). Следует отметить, что развитие побегов в каллусе из почек наблюдали даже на каллусогенной среде МС160, которая у листового каллуса морфогенез не индуцировала.

Побеги, полученные в каллусной культуре лаванды, для дорастивания переводили на среду МС с добавлением 0,5 мг/л Кин и 0,1 мг/л ГК<sub>3</sub>, а затем для укоренения на среду МС с половинной концентрацией солей, сахарозы и 1,0 мг/л ИМК [59]. Частота укоренения *in vitro* варьировала в зависимости от генотипа и пассажа и достигала 60-87%. Укорененные регенеранты лаванды переносили в обычные условия выращивания в стаканчики со смесью торфа, перлита и керамзита (1:1:1) и использовали традиционные приемы адаптации пробирочных растений при повышенной влажности. Частота приживаемости *in vivo* регенерантов из каллуса 1-го пассажа составила у сорта Синева 94,1%, но по мере увеличения пассажа снижалась: у регенерантов из 2-го пассажа – до 85,7%, из 4-го – до 72,6%, из 6-7-го – до 29,6%. После адаптации регенеранты переносили в вазоны с землей, а затем в открытый грунт в полевые условия.

## 2.5 Изучение влияния обработки колхицином на процессы каллусо- и морфогенеза

Мутагенная обработка широко применяется в разных биотехнологиях для повышения уровня и расширения спектра изменений *in vitro* [37, 112, 159, 191, 223, 226, 255, 549]. Для *L. vera* в литературе имеются данные о получении тетраплоидов при культивировании верхушек стебля на среде с колхицином [552], а также по использованию  $\gamma$ -облучения при создании продуцирующих биотин клеточных линий [596]. В нашей работе в качестве химического мутагена использовали колхицин, применяемый не только для получения полиплоидов [130, 160, 363, 544, 549, 604], но и других типов мутаций [37, 111, 255, 316, 467].

В проведенных экспериментах каллусные ткани лаванды сорта Степная культивировали на питательных средах с добавлением колхицина в концентрациях от 1 до 1000 мг/л при различных экспозициях (6, 12, 21 сут), а затем переносили на среды для каллусо- или морфогенеза. При анализе действия колхицина на рост неморфогенного каллуса из листовых эксплантов подобран сублетальный режим обработки (концентрация 100 мг/л и экспозиция 12 сут), при котором ростовой индекс каллуса снижался в 2,5 раза по сравнению с контролем. После мутагенного воздействия каллусные культуры хорошо отрастали, хотя и не проявили способность к индукции морфогенеза.

Исследовано накопление ДНК в интерфазных ядрах каллусных клеток после различных режимов обработки колхицином на 6-е и 12-е сут цикла выращивания (конец экспоненциальной и начало линейной фаз роста) и 30-е сут (стационарная фаза) (табл. 2.4). Установлено, что в контроле в течение цикла выращивания происходило изменение пределов варьирования ДНК от 0,8С до 19,7С. В дальнейшем основная часть популяции (35-37%) была представлена клетками с 2С и 4С ДНК.

Сразу после обработки каллусов колхицином (6-е и 12-е сут) число клеток, содержащих более 8С ДНК, значительно возросло, и содержание ДНК варьировало от 1,1С до 60,4С (см. табл. 2.4). При сублетальной (100 мг/л) и особенно летальной (1000 мг/л) дозах колхицина у многих клеток наблюдали фрагментацию ядер, политению, а также образование ядер неправильной формы и микроядер. Вместе с тем, при различных концентрациях колхицина выявили сходную картину распределения клеток различных классов пloidности. И в целом суммарное содержание клеток с 2С-4С ДНК во всех вариантах на 6-12-е сут составило около 30%.

**Таблица 2.4 Влияние колхицина на содержание ДНК в клетках каллуса, полученного из эксплантов листа лаванды сорта Степная**

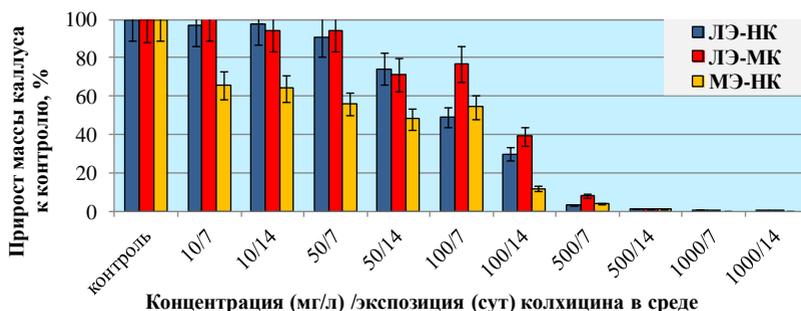
Длительность культивирования, сут.	Обработка колхицином		Содержание ДНК, С	
	концентрация, мг/л	экспозиция, сут	Lim	X±S <sub>x</sub>
0	контроль		0,8-12,6	3,8±0,2
6	контроль		1,1-19,7	6,6±0,3
12	контроль		1,4-12,2	4,0±0,2
30	контроль		1,1-12,1	3,9±0,2
6	10,0	6	1,8-37,5	11,0±0,9*
12	10,0	10	1,1-39,2	9,9±0,7*
6	100,0	6	1,1-60,4	10,9±0,9*
12	100,0	10	1,1-40,5	12,2±0,9
6	1000,0	6	1,2-42,3	9,9±1,0*
12	1000,0	10	1,4-47,4	10,0±0,9*
30	10,0	10	1,2-14,6	4,0±0,2
30	100,0	6	1,5-16,9	6,4±0,3*
30	100,0	10	1,2-12,9	4,7±0,3
30	1000,0	6	1,9-43,5	12,4±0,9*

\*Различия с контролем достоверны при  $p \leq 0,05$

После культивирования на среде с колхицином каллусы переносили на контрольную среду. К концу цикла выращивания (30-е сут.) в большинстве вариантов опыта исчезли клетки, содержащие более 12-16С ДНК, что напоминало распределение клеток в контроле. По-видимому, это произошло за счет преимущественного размножения клеток с низким, более "нормальным", содержанием ДНК. После обработки колхицином в концентрации 100 мг/л число клеток с содержанием ДНК 8С и более возросло до 20-25%, тогда как в контроле содержание таких клеток не превысило 2-4%.

В следующей серии экспериментов изучено влияние концентрации и экспозиции колхицина, типа экспланта (лист, меристема из почки), типа каллуса (неморфогенный, морфогенный) и состава среды на процессы каллусо- и морфогенеза (рис. 2.12). В большинстве вариантов опыта при действии колхицина происходило угнетение пролиферации каллуса. Низкая концентрация (10 мг/л) не вызывала снижения массы у каллуса из листа, хотя для каллуса из меристем отмечено достоверное снижение РИ. Повышение концентрации колхицина до 50 мг/л приводило к уменьшению РИ у листового каллуса обоих типов. Дальнейшее увеличение концентрации этого мутагена вызывало угнетение роста каллуса, вплоть до его некроза при 1000 мг/л.

Полученные данные свидетельствуют о том, что на чувствительность каллусных культур к колхицину влиял тип экспланта – у каллусов, полученных из листьев, прирост массы к контролю в большинстве вариантов опыта был в 1,5-2,2 раза выше, чем у каллусных культур, полученных из меристем. Для меристемного каллуса сублетальной дозой колхицина была обработка 100 мг/л в течение 14 сут (прирост 11,8% к контролю), тогда как у листового неморфогенного каллуса при этой дозе прирост к контролю был выше – 29,9%.



**Рис. 2.12. Влияние концентрации и экспозиции колхицина в питательной среде, типа экспланта и каллуса на прирост массы каллуса лаванды сорта Степная.**

ЛЭ-НК – неморфогенный каллус из листового экспланта; ЛЭ-МК – морфогенный каллус из листового экспланта; МЭ-НК – неморфогенный каллус из меристем

Выявлены различия в реакции на мутагенное воздействие разных типов каллусов лаванды. Обработка морфогенного каллуса колхицином при высоких концентрациях (100-500 мг/л) приводила к меньшему угнетению его прироста, чем у неморфогенного – прирост массы был на 10-24% выше. Сублетальная доза колхицина у морфогенного каллуса была выше (500 мг/л – 7 сут), чем у неморфогенного каллуса (100 мг/л – 14 сут). Такое лучшее отрастание морфогенного каллуса после мутагенеза может быть связано с наличием у него большего числа меристематических клеток.

Важным методическим вопросом является выбор среды для пересадки каллусов после действия колхицина. Показано преимущество использования при субкультивировании каллусов после мутагенеза вначале среды для пролиферации каллуса (МС160), а затем после его отрастания – среды для морфогенеза (МС427). Так, при переносе

каллуса на среду МС427 РИ снижался в 8-10 раз, а на среду МС160 – всего в 1,2-2,7 раз. В дальнейшем, при культивировании во 2-м пассаже происходило восстановление пролиферативной активности, и на среде МС427 ростовые индексы листовых каллусов были почти на уровне контроля. Однако у каллусов меристемного происхождения во 2-м пассаже ростовая активность восстановилась не во всех вариантах опыта, что свидетельствует об их более высокой чувствительности к мутагенной обработке, проявление которой отмечали даже после 3-4 месяцев.

Основной проблемой при мутагенезе *in vitro* обычно является потеря способности к регенерации растений. Поэтому в наших экспериментах, наряду с неморфогенным каллусом, был использован морфогенный листовой каллус, а также каллусы меристемного происхождения. Установлено, что после снятия мутагенной нагрузки у морфогенных каллусов происходило развитие почек и побегов с частотой от до 46,2%. У неморфогенных каллусов даже через 2-3 месяца на среде МС427 индукции морфогенеза не наблюдали. В 3-4-ом пассажах у 33-60% каллусов из меристем после обработки колхицином формировались почки, однако развития побегов из них не происходило. При использовании морфогенных каллусных культур индукция почек и единичных побегов отмечалась уже во 2-м пассаже, хотя частота морфогенеза в вариантах с мутагенной обработкой была в 1,2-3,5 раз ниже, чем в контроле (63,6%). По мере увеличения концентрации и экспозиции мутагена частота морфогенеза снижалась с 53,8% до 18,2%. При культивировании в 3-5-м пассажах у 20–66% каллусов (в зависимости от варианта обработки) развивались почки и побеги.

Данные факты свидетельствуют о преимуществе использования для мутагенной обработки морфогенного каллуса, так как он более устойчив к действию колхицина и сохраняет регенерационную способность. Однако развитие почек и побегов после действия колхицина было замедлено. Кроме того, иногда наблюдали формирование тератологических побегов и маложизнеспособных регенерантов. Судя по имеющимся литературным данным, у многих видов растений обработка мутагенами приводила к значительному угнетению развития не только каллусов, но и регенерантов, и появлению аномальных форм [12, 222, 255, 467, 604]. Для некоторых растений также было отмечено влияние на эффективность мутагенеза и процессы регенерации вида и доз мутагена, способа обработки, сорта, исходного объекта или типа каллуса [85, 111, 130, 159, 316, 363, 467, 544, 549, 604].

## 2.6 Методологические основы клеточной селекции лаванды на устойчивость к осмотическому стрессу

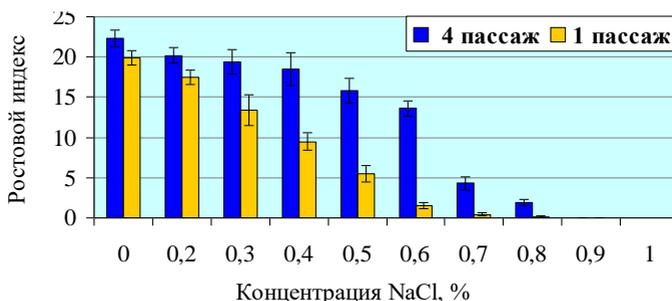
Получение новых высокопродуктивных и пластичных сортов лаванды может быть успешным только при наличии разнообразного исходного селекционного материала, при этом важную роль играет создание генотипов, устойчивых к абиотическим стрессам, и, в частности, к засухе, засолению почв. Одним из эффективных подходов в решении этой проблемы является клеточная селекция, позволяющая отбирать резистентные клетки в селективных условиях *in vitro* [37, 47, 49, 90, 191, 226, 511]. Во многих работах для скрининга устойчивых к водному дефициту форм использовали каллусы, которые культивировали на средах с добавлением ионных или неионных осмотиков – NaCl, маннита, полиэтиленгликоля [2, 47, 117, 191, 214, 254, 317, 565]. Сведений об исследованиях по клеточной селекции лаванды практически нет, за исключением работы А.М. Sodi с соавторами о влиянии NaCl на рост каллуса лавандина [553]. Поэтому в задачи нашей работы входило изучение действия различных селективных факторов (NaCl и маннита) на каллусо- и морфогенез у лаванды с целью разработки методов клеточной селекции на устойчивость к осмотическому стрессу.

На начальных этапах исследовали действие NaCl на прирост неморфогенных каллусов из эксплантов листа, при этом анализировали влияние разных концентраций соли, исходного пассажа, сорта, продолжительности стресса и питательной среды, используемой после снятия стресса (рис. 2.13, 2.14). Установлено, что при добавлении в среду 0,2% NaCl при культивировании каллусов 1-го и 4-го пассажей происходило достоверное снижение РИ каллуса по сравнению с контролем. Дальнейшее увеличение концентрации соли привело к более сильному угнетению роста каллуса. Сублетальная доза для каллуса первого пассажа составила 0,7% NaCl (РИ до 13,2% к контролю). При больших концентрациях соли наблюдали некроз каллуса.

При использовании для клеточной селекции каллуса 4-го пассажа отмечен лучший прирост по сравнению с 1-м пассажем (см. рис. 2.13). В частности, при добавлении в питательную среду 0,6% NaCl РИ составил 13,6, а у каллуса 1-го пассажа – всего 1,5. Учитывая более высокий прирост массы у каллусов 4-го пассажа, можно отбирать больше солеустойчивых линий при более высоких концентрациях NaCl. Для каллусов 4-го пассажа сублетальная концентрация NaCl (0,8%) была

выше по сравнению с первым пассажем (0,7%). При сублетальных дозах NaCl пролиферацию каллуса наблюдали не более 2-3 пассажей, однако после снятия селективной нагрузки происходило восстановление ростовой активности отобранных линий. Аналогичные данные были получены для сорта Степная.

Исходя из вышесказанного, для клеточной селекции на устойчивость к NaCl у лаванды предпочтительно использовать исходные каллусы 4-го пассажа. Лучший прирост таких культур на стрессовом фоне и более эффективный отбор устойчивых линий, по-видимому, обусловлен большей гетерогенностью клеточной популяции в более позднем пассаже и появлением устойчивых генотипов. Повышение вариабельности клеток при длительном культивировании каллусов лаванды было выше продемонстрировано на примере изменчивости содержания ядерной ДНК.

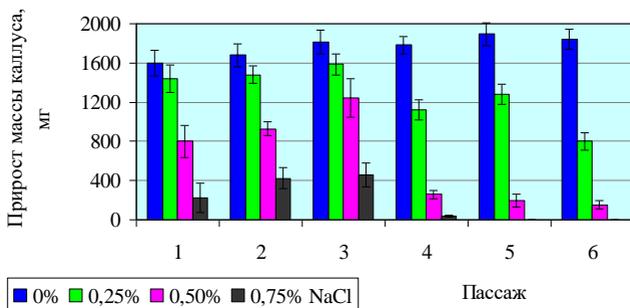


**Рис. 2.13 Влияние концентрации NaCl и исходного пассажа на ростовой индекс каллуса лаванды сорта Синева**

Полученные данные косвенно свидетельствуют о большей солеустойчивости сорта Синева по сравнению со Степной на уровне изолированных тканей (см. рис. 2.13). Каллусы сорта Синева имели более высокие РИ (особенно при высоких концентрациях соли) и сублетальную дозу NaCl, по сравнению с сортом Степная (соответственно 0,8 и 0,7%).

Исследовано влияние продолжительности действия осмотического стресса на пролиферацию каллусных культур. Для этого отобранные при трех концентрациях NaCl (0,25;0,5;0,75%) клеточные линии сорта Степная субкультивировали при исходной концентрации соли в течение шести пассажей (см. рис. 2.14). Как видно из представленных данных, при селективных концентрациях 0,25 и 0,5% NaCl культивирование

калусных линий возможно в течение шести пассажей. На среде с сублетальной концентрацией NaCl (0,75%) при культивировании отобранных линий прирост массы каллуса отмечался в течение трех пассажей (ПИ до 17% от контроля).

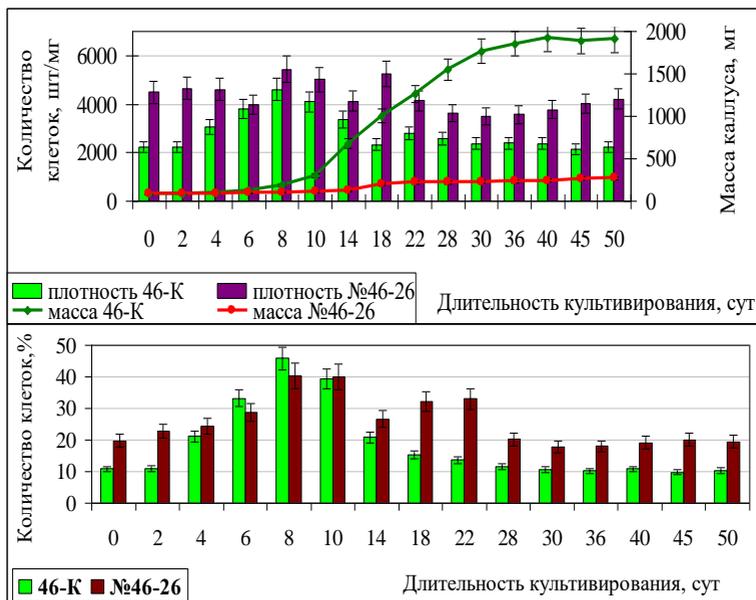


**Рис. 2.14** Влияние длительности пассирования и концентрации NaCl на прирост массы каллуса лаванды сорта Степная

Изучена динамика некоторых цитофизиологических показателей популяции клеток устойчивой линии № 46-26 (выделенной после отбора в течение шести пассажей на среде с 0,5% NaCl) и исходной контрольной линии 46-К (рис. 2.15). В цикле выращивания у обеих линий наблюдали различия по всем изученным параметрам. У устойчивой линии ростовой индекс был почти в 8 раз меньше, чем у контрольной. Также отмечен более продолжительный лаг-период – 6-8 сут (у контрольной – 3 сут). Установлено, что у линии № 46-26 скорость прироста биомассы в линейной и экспоненциальной фазах снижалась почти в 10 раз по сравнению с контрольной (соответственно 6,4 и 75,7 мг/сут). Для устойчивых к вольфраму клеточных линий табака и сои обнаружено аналогичное замедление темпов роста, что приводило к увеличению длительности пассажа с 35 до 65 сут [259]. У линии лаванды № 46-26 также выражена тенденция увеличения продолжительности пассажа – на 50-е сут отмечали прирост биомассы, тогда как в контроле он отсутствовал.

У устойчивой линии почти во всех фазах цикла выращивания плотность каллуса была в 1,5-2 раза выше, также отмечено более высокое содержание мелких меристематических и низкое количество паренхимных клеток по сравнению с контрольной линией. Перестройка клеточной популяции у отобранной линии, которая привела к изменению

соотношения разных типов клеток, уменьшению их размеров, и снижению объемов межклетников (т.е. более плотной "упаковкой" клеток), по-видимому, является результатом действия осмотического стресса.



**Рис. 2.15** Динамика изменения массы, плотности каллуса (вверху) и количества клеток меристематического типа (внизу) в цикле выращивания исходной (46-К) и солеустойчивой клеточной линии (№46-26) лаванды сорта Степная

При изучении накопления пролина в каллусе показано, что у отобранной на фоне 0,5% NaCl устойчивой линии уровень этой аминокислоты был на 32,2% выше, чем у исходной, контрольной. Известно, что пролин играет важную роль в формировании резистентности растений к абиотическим стрессам, и в частности, к засухе [97, 105, 191]. Имеются сведения о накоплении этой аминокислоты у отобранных *in vitro* устойчивых клеточных линий и регенерантов некоторых видов растений [48, 117, 190, 324, 438]. Можно предположить, что накопление пролина у выделенной линии лаванды является косвенным показателем формирования устойчивости в результате клеточной селекции.

Одной из основных проблем при клеточной селекции у многих видов растений является снижение или даже потеря морфогенетического потенциала у отобранных устойчивых линий [14, 37, 608]. В наших экспериментах при использовании недифференцированных каллусов у солеустойчивых линий выявлено снижение в 4-5 раз частоты морфогенеза по сравнению с контрольными. В связи с этим исследовали действие NaCl на развитие морфогенных каллусных культур лаванды (табл. 2.5). Установлено, что при использовании в качестве объекта селекции морфогенного каллуса сублетальная концентрация NaCl (при которой наблюдали незначительный прирост каллуса и образование почек у 7,5% трансплантов) достигала 0,9%. Культивирование при этой сублетальной дозе было возможно в течение одного пассажа, после которого отбирали устойчивые линии. Однако при переносе этих линий на среду для регенерации, не содержащую NaCl, в следующем 2-м пассаже происходило восстановление роста почти до уровня контроля (см. табл. 2.5). Так, у устойчивой линии РИ увеличился до 10,2 (в контроле 12,9), а частота морфогенеза возросла до 76,5% (в контроле 100%). В дальнейшем у таких линий наблюдали регенерацию побегов.

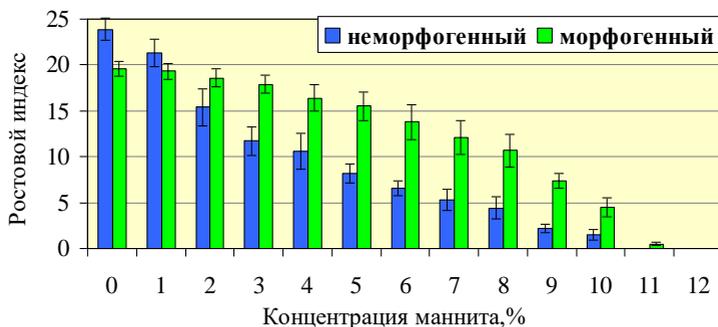
Таким образом, сравнивая два типа объектов (неморфогенный и морфогенный каллус), можно с уверенностью говорить о преимуществе использования морфогенных культур для клеточной селекции на устойчивость к NaCl. Это связано с возможностью использования более высокой дозы стрессового фактора (0,9% NaCl), по сравнению с неморфогенным каллусом (0,7-0,8%NaCl). Однако более существенным при использовании морфогенного каллуса является сохранение регенерационного потенциала и возможности получения растений из устойчивых линий.

Для моделирования осмотического стресса помимо NaCl также использовали маннит. При культивировании каллусов на питательной среде с этим осмотиком установлено, что на их прирост оказывали влияние концентрация маннита, тип самого каллуса, а также продолжительность культивирования в селективных условиях. Как видно из представленных на рис. 2.16 данных, у неморфогенного каллуса концентрация маннита 2% оказала селективное влияние и достоверное снижение РИ. Концентрация 10% была сублетальной – РИ достигал всего 1,5 (в контроле 23,9). При добавлении в среду 11-12% маннита наблюдали потемнение и некроз каллуса этого типа [62].

**Таблица 2.5 Влияние концентрации NaCl и пассажа на ростовой индекс и частоту морфогенеза в морфогенном каллусе лаванды сорта Синева**

№ пассажа в опыте	Содержание NaCl, % (1 пассаж/ 2 пассаж)	Ростовой индекс каллуса	Частота морфогенеза, %
1	0,0	17,8±0,3	88,9±3,6
	0,4	12,6±0,9*	65,4±5,3*
	0,5	11,3±1,2*	45,5±5,2*
	0,6	5,7±0,3*	14,3±3,1*
	0,7	3,5±0,3*	20,0±4,0*
	0,8	2,3±0,2*	6,3±1,9*
	0,9	0,7±0,2*	7,5±2,1*
	1,0	0,0	0,0
2	0,0/0,0	12,9±0,4	100
	0,6/0,6	6,7±0,2*	37,5±4,2*
	0,6/0,0	8,8±0,3*	68,8±4,8*
	0,7/0,7	0,4±0,1*	5,9±2,1*
	0,7/ 0,0	11,7±0,5	86,7±4,0*
	0,8/0,8	0,0	0,0
	0,9/0,9	0,0	0,0
	0,8/0,0	10,2±0,3*	76,5±4,5*
	0,9/0,0	1,2±0,2*	10,6±2,8*

\* Различия с контролем (без NaCl) достоверны при  $p \leq 0,05$



**Рис. 2.16 Влияние концентрации маннита в питательной среде и типа каллуса лаванды на его ростовой индекс**

Морфогенные каллусные культуры проявили большую устойчивость к осмотическому стрессу, при этом РИ и прирост к контролю по сравнению с неморфогенным каллусом были более высокими почти во всех вариантах опыта. Селективная концентрация маннита у морфогенного каллуса была гораздо выше (4%), а сублетальная (при которой наблюдали минимальный прирост отдельных трансплантов) составила 11% [62].

Субкультивирование выделенных на питательной среде с 8-10% маннита устойчивых линий на средах с осмотиком было возможно в течение трех пассажей. Следует отметить, что на фоне селективного фактора у отобранных линий не развивались почки и побеги. В дальнейшем эти линии переводили на морфогенную среду без осмотика.

У многих отобранных линий лаванды при переносе на регенерационную среду наблюдали незначительное отрастание каллуса, поэтому сразу после снятия селективной нагрузки их необходимо 3-4 недели культивировать на питательной среде для пролиферации каллуса, и только потом переносить на среду для индукции морфогенеза. Тем не менее, из морфогенных штаммов было выделено несколько устойчивых к манниту линий, которые после осмотического стресса хорошо росли на среде для регенерации (РИ до 78% от контроля), и у них наблюдали развитие адвентивных почек. Из таких устойчивых линий в дальнейшем получили несколько регенерантов. При этом регенерация полноценных растений была возможна только из морфогенных линий, отобранных на среде с маннитом в концентрации не выше 8%. Поэтому, несмотря на возможность получения устойчивых линий на фоне 9-11% этого осмотика, для клеточной селекции лаванды целесообразно использовать концентрацию 8% маннита.

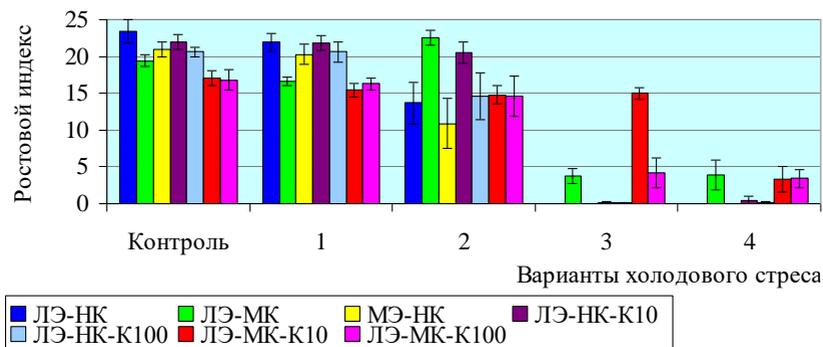
Проростки, полученные из устойчивых к NaCl или манниту каллусных линий, размножали *in vitro*. На всех этапах размножения у регенерантов из устойчивых линий отмечено снижение некоторых параметров по сравнению с регенерантами из контрольных исходных штаммов [62]. В частности, длина и число адвентивных побегов, а также частота укоренения и приживаемости *in vivo* у них были в 1,2-2,3 раза ниже. Для некоторых видов растений отмечали аналогичные особенности регенерантов из устойчивых линий, свидетельствующие об их более слабом развитии и аномалиях по сравнению с исходными формами [2, 47, 51, 214, 317].

С целью проверки признака устойчивости на уровне изолированных меристем регенеранты, полученные из устойчивых к манниту линий, культивировали на питательной среде с 8% маннита [62]. Установлено, что у исходного сорта Степная и регенеранта из контрольной линии на среде с осмотиком все показатели развития меристем снижались в 4-6 раз по сравнению с контрольной средой. При этом формирования адвентивных микропобегов не наблюдали. У регенерантов из устойчивых линий, маннит в питательной среде в меньшей степени ингибировал развитие меристем, и почти все изученные показатели не имели достоверных отличий по сравнению со средой без маннита. Анализ устойчивости регенерантов к осмотическому стрессу на уровне изолированных меристем подтвердил эффективность такого методического подхода. На основе полученных данных впервые разработана схема клеточной селекции лаванды для отбора форм, устойчивых к осмотическому стрессу, которая включена в биотехнологическую систему создания новых форм лаванды *in vitro*.

## **2.7 Разработка селективной системы на устойчивость к низкотемпературному стрессу**

С целью разработки режимов клеточной селекции у лаванды было изучено действие низкотемпературного стресса на развитие каллусных культур. В ходе предварительных опытов выявлена необходимость проведения закалки и возможность отбора каллусов при отрицательных температурах, показана сортовая вариабельность по устойчивости к холодовому стрессу, а также продемонстрировано преимущество использования для холодной обработки каллусов на линейной фазе цикла выращивания [72]. В экспериментах обработку каллусных культур проводили в три этапа: вначале закаливание при +6-0°C (4-6 сут), затем промораживание (при постепенном снижении температуры от 0 до -14-16°C) и оттаивание (при 0-+6°C 4-6 сут). В контроле каллусы выращивали при +26°C. На примере сорта Степная изучено влияние на каллусо- и морфогенез различных вариантов промораживания, типа экспланта (лист, меристема), типа каллуса (неморфогенный и морфогенный), предварительной обработки колхицином (10 и 100 мг/л в течение 14 сут). При этом было испытано 4 режима промораживания при снижении температуры: 1 – до -10°C (10 сут); 2 – до -10°C (12 сут); 3 – до -12°C (16 сут); 4 – до -14°C (19 сут). После холодового стресса транспланты переносили на свежую среду и культивировали при +26°C,

а в конце цикла выращивания определяли ростовой индекс каллуса и частоту морфогенеза (рис. 2.17).



**Рис. 2.17 Влияние низкотемпературного стресса, типа каллуса и экспланта, предобработки колхицином на прирост массы каллуса лаванды сорта Степная**

Типы каллуса: ЛЭ-НК – каллус из листа, неморфогенный; ЛЭ-МК – каллус из листа, морфогенный; МЭ-НК – каллус из меристем, неморфогенный. Обработка колхицином: К10 – 10 мг/л (14 сут); К100 – 100 мг/л (14 сут)

Как видно из представленных данных, при 2-м режиме холодового стресса происходило достоверное снижение РИ каллуса (за исключением вариантов с использованием морфогенного каллуса и колхицина). Третий режим оказал летальное действие на листовые неморфогенные и меристемные каллусы, приводя к их некрозу. Обработка колхицином листового неморфогенного каллуса способствовала повышению устойчивости – наблюдали небольшой прирост каллуса. Лучше всего выдерживали третий режим морфогенные каллусы с обработкой колхицином (10 и 100 мг/л), у которых РИ составил 29,2 и 88,3% к контролю. Четвертый режим низкотемпературного стресса оказал летальное действие в большинстве вариантов опыта. Прирост биомассы отмечен только у морфогенного каллуса (до 28% от контроля) и у неморфогенного каллуса с обработкой колхицином (до 6,5% от контроля).

Полученные результаты позволили выявить сублетальные режимы промораживания: у неморфогенного листового и меристемного каллусов – 2-й режим, а у морфогенного листового и неморфогенного каллусов с

обработкой колхицином – 4-й режим промораживания. Судя по литературным данным, в клеточной селекции на устойчивость к низким температурам исследователи моделировали холодовой стресс при использовании как низких положительных [35, 324, 592], так и отрицательных температур [37, 136, 196]. В нашей работе сублетальный эффект оказало промораживание каллусов лаванды до  $-14^{\circ}\text{C}$  в течение достаточно продолжительного времени (19 сут). Хотя имеются сведения о применении более короткой экспозиции, например, у пшеницы промораживание до  $-20^{\circ}\text{C}$  проводили 1 час [196].

Тип экспланта не оказал существенного воздействия на устойчивость каллусных тканей к низким температурам – при использовании в качестве эксплантов листьев и меристем сублетальные дозы были одинаковы, достоверно не различались РИ и частота индукции морфогенеза. В то же время А.С. Лукаткин при выделении устойчивых к холоду линий огурца и кукурузы отметил зависимость холодового повреждения от типа экспланта [121].

Значительное влияние на устойчивость к холодовому стрессу оказал тип каллуса. Морфогенные каллусы проявили большую устойчивость к низким температурам по сравнению с неморфогенными – у них была выше сублетальная доза (4-й режим промораживания), прирост массы к контролю достигал 115% (а у неморфогенных 60%), что позволило выделить больше устойчивых линий.

Мутагенная обработка каллусных культур способствовала повышению устойчивости к стрессу и выделению большего числа линий при более жестких режимах. По-видимому, это обусловлено появлением при действии колхицина большего числа мутантных устойчивых клеток. В значительной степени эффект такой обработки проявился у неморфогенных каллусов, у которых только после действия колхицина наблюдали небольшой прирост после 3-го и 4-го режимов холодового стресса, которые для необработанного каллуса были летальными. Полученные данные о преимуществе использования мутагенной предобработки для выделения устойчивых линий лаванды согласуются с рядом работ, в которых при клеточной селекции используется этот этап [14, 37, 117, 191].

После холодового стресса (особенно при 2-3-м режимах) наблюдали значительную вариабельность каллусов по ростовой активности. Наряду с не растущими клонами, появлялись единичные устойчивые каллусные линии с РИ, близкими к контролю. Установлено,

что для дорастивания как неморфогенного, так и морфогенного каллуса после холодового стресса лучше использовать среду для каллусогенеза (МС160), на которой РИ были в 1,5-3 раза выше, чем на среде для индукции морфогенеза (МС 427).

У нескольких полученных линий на стационарной фазе цикла выращивания проанализировано содержание свободного пролина. У каллусных линий, отобранных без предварительной мутагенной обработки, содержание этой аминокислоты достоверно не отличалось (36,7-39,5 мкг/г) или было ниже (28,7 мкг/г), чем у контрольной (41,2 мкг/г). Для двух линий, отобранных после промораживания из морфогенных каллусов с использованием колхицина, выявлено достоверное повышение содержания пролина (79,1 мкг/г) по сравнению с исходной линией. Учитывая известные данные об участии этой аминокислоты в формировании устойчивости к абиотическим стрессам, в том числе и к холодовому [117, 191, 324, 566], можно косвенно судить о высокой устойчивости к холодовому стрессу у нескольких выделенных линий лаванды.

С целью проверки устойчивости полученных в результате клеточной селекции линий была проведена их повторная холодовая обработка при более жестких режимах (снижении температуры до -14°C в течение 18-22 сут). Установлено, что каллусные линии с предварительной мутагенной обработкой проявили большую устойчивость к повторному низкотемпературному стрессу – у них отрастало до 15,6% трансплантов, а линии, выделенные без такой обработки, после второго этапа погибли. Данные факты свидетельствуют об эффективности использования обработки колхицином для селекции *in vitro* у лаванды, а также о сохранении признака устойчивости у отдельных выделенных линий.

Важнейшей проблемой при клеточной селекции является сохранение регенерационной способности у выделенных устойчивых клеточных линий. У линий лаванды, отобранных из устойчивых неморфогенных каллусов, при переводе на регенерационную среду МС427 в первом пассаже не выявлено способности к морфогенезу. После холодового стресса индукцию морфогенеза наблюдали только у линий, отобранных из морфогенных каллусов. В следующих, 2-3-м пассажах, развитие почек и побегов происходило только у линий, полученных после мутагенной обработки. При этом у отобранных холодоустойчивых линий частота морфогенеза снижалась в 3-5 раз, а развитие почек было

замедленным. Полученные данные позволили разработать схему клеточной селекции на устойчивость к низким температурам у лаванды, представленную в итоговой биотехнологической системе получения новых форм.

## **2.8 Исследование морфогенеза в культуре меристем и оптимизация условий клонального микроразмножения *in vitro***

Клональное микроразмножение широко используется для ускоренного размножения ценных генотипов и получения оздоровленного посадочного материала [94, 99, 115, 140, 291]. При разработке клеточных технологий также важно быстро размножить для последующих полевых испытаний регенеранты, полученные в культуре изолированных тканей. При оптимизации условий клонального микроразмножения лаванды в качестве эксплантов при введении в культуру *in vitro* использовали меристемы из растений различных сортов, выращиваемых в условиях закрытого грунта, или адаптированных *in vivo* регенерантов.

Установлено, что на первом этапе введения меристем происходило развитие не только основного побега, но и дополнительных, за счет развития пазушных почек или образования адвентивных побегов. Частота множественного побегообразования достигала 74-100%, в зависимости от сорта [67]. На некоторых средах у основания побега формировался небольшой морфогенный каллус, что при микроразмножении является нежелательным из-за вероятности появления измененных соматоклональных вариантов. Этот факт учитывали при оптимизации состава сред, а в случае появления каллуса его тщательно удаляли при пересадке микропобегов из меристем.

Одним из основных факторов, определяющих развитие изолированных меристем лаванды, является состав питательной среды. На основании предварительных опытов в качестве основной выбрана питательная среда МС, дополненная цитокининами. Это обусловлено тем, что введение в среду, наряду с цитокининами, ауксинов часто приводило к образованию каллуса. При использовании разных цитокининов установлено преимущество Кин по сравнению с БАП и зеатином (табл. 2.6). Среда с добавлением БАП индуцировала развитие каллуса с частотой 46,8-100%. Добавление в питательную среду зеатина привело к снижению основных показателей, по сравнению с Кин – почти в 2 раза уменьшились длина и количество побегов, число узлов.

Введение в среду, наряду с Кин и ГК<sub>3</sub>, ауксинов (ИУК, ИМК) также было неэффективным. Наиболее подходящими для культивирования меристем лаванды были среды с добавлением 1-2 мг/л Кин и 0,5 мг/л ГК<sub>3</sub>. На этих средах развивалось до 100% эксплантов и формировались микропобеги длиной 10-15 мм с 3-4 парами листьев. При этом наблюдали множественное побегообразование с частотой до 100% и формирование из меристемы в среднем от 1,2 до 9,2 побегов (см. табл. 2.6).

**Таблица 2.6 Влияние состава питательной среды на развитие меристем лаванды на 1 этапе микроразмножения**

Гормональные добавки в среде МС, мг/л	Длина побега, мм	Кол-во узлов на побег, шт.	Частота множественного побегообразования, %	Кол-во побегов на эксплант, шт.	Частота калусогенеза, %
б/г	5,3±0,5	1,1±0,2	6,5	1,2±0,1	0
Кин(1,0)+ИУК(0,5)+ГК <sub>3</sub> (0,5)	6,8±0,4	2,2±0,2	100	8,8±0,6	63,7
Кин(1,0)+ИМК(0,5)+ГК <sub>3</sub> (0,5)	16,2±1,3	3,7±0,3	85,7	4,3±0,7	50,1
Кин(2,0)+ГК <sub>3</sub> (0,1)	11,8 ±0,8	3,5±0,2	100	8,1±1,1	0
Кин(2,0)	9,1±0,4	3,0±0,3	88,2	7,9±0,7	0
Кин(1,0)+ГК <sub>3</sub> (0,5)	15,2±0,3	4,2±0,3	100	9,2±1,1	0
Кин(1,0)+ГК <sub>3</sub> (0,5); сах.1%	7,2±0,4	2,3±0,2	100	8,2±0,7	0
БАП(1,)+ГК <sub>3</sub> (0,5)	12,1±0,8	3,1±0,2	100	7,9±0,5	100
БАП(2,0)+ГК <sub>3</sub> (0,1)	10,6±0,8	3,1±0,2	83,5	5,2±0,4	46,8
БАП(2,0)	9,5±0,8	3,0±0,2	92,5	4,9±0,4	58,9
Зеатин(2,0)+ГК <sub>3</sub> (0,1)	5,2±0,5	1,7±0,2	92,5	5,0±0,5	0

Установлено, что на первом этапе микроразмножения также значительное влияние на развитие эксплантов оказывал генотип, в частности, максимальной способностью к образованию дополнительных побегов характеризовался сорт Синева. Вместе с тем при культивировании меристем разных размеров (0,3-0,4 и 0,6-0,8 мм) не выявлено достоверных различий по морфометрическим показателям развития эксплантов. [67].

Для дальнейшего размножения полученные после введения *in vitro* побеги разделяли на микрочеренки (5-10 мм) с одним узлом и парой листьев и переносили на свежую питательную среду. При этом исследовали влияние на развитие эксплантов состава питательной среды и цикла микроразмножения. На втором этапе собственно

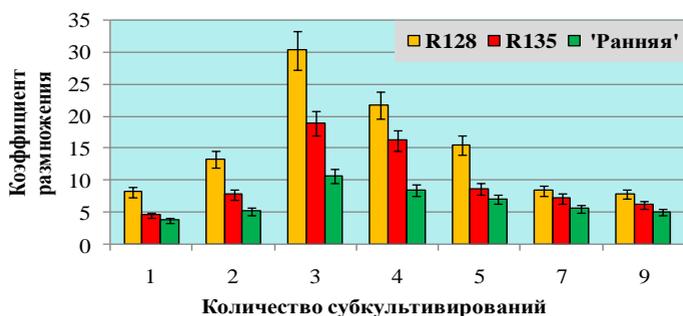
микроразмножения отмечали формирование 1-2 побегов из пазушных почек микрочеренка длиной до 20-30 мм с 3-5 узлами и до 6-10 дополнительных побегов (рис. 2.18 А). Частота множественного побегообразования достигала 75-100%. У изученных сортов на данном этапе почти не отмечали индукции формирования каллуса или ризогенеза, а также развития оводненных побегов. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования для размножения лаванды нескольких методов – микрочеренкования побегов, а также индукции пазушного и адвентивного побегообразования, что позволяет повысить коэффициент размножения. На этом этапе один из важнейших параметров – это коэффициент размножения. Его рассчитывали как количество микрочеренков, которое можно получить за одно субкультивирование, для этого количество образующихся на экспланте побегов умножали на число узлов на побеге.



**Рис. 2.18 Развитие адвентивных побегов на 2-м этапе микроразмножения (А), укоренение *in vitro* (Б), адаптация *in vivo* (В) лаванды сорта Степная**

Проведенный анализ питательных сред, различающихся по содержанию регуляторов роста, сахарозы и минеральных солей, позволил выявить ряд общих закономерностей для изученных сортов лаванды (Степная, Синевая, Ранняя, Вдала, Волна, Крымчанка и др.). В качестве основных модификаций испытаны среды МС с Кин и ГК<sub>3</sub>, используемые на первом этапе микроразмножения. Установлено, что замена в этих средах Кин на БАП или добавление ауксинов, снижение концентрации сахарозы или солей, как правило, приводили к увеличению частоты каллусогенеза до 60-100%. На многих средах

отмечали появление оводненных побегов, достигающее 70-80%. В некоторых работах по размножению лаванды *in vitro* авторы также указывали на развитие витрифицированных побегов, которое зависело от концентрации солей, гормонов, сахарозы или агара в питательной среде [250, 370, 436, 613]. Для уменьшения оводненности побегов мы использовали снижение содержания гормонов и макро- и микросолей, однако при этом происходило уменьшение интенсивности множественного побегообразования. Вместе с тем, возможно снижение концентрации сахарозы до 1%. Согласно полученным данным, более подходящими для этапа собственно микроразмножения являются модификации среды МС с добавлением 0,5-1,0 мг/л Кин и 0,1-0,5мг/л ГК<sub>3</sub>. На этих средах отмечали развитие из микрочеренков побегов до 20-30 мм с 4-5 узлами и 7-14 дополнительными побегами. За счет использования микрочеренкования и множественного побегообразования коэффициент размножения достигал, в зависимости от генотипа и числа субкультивирований, достаточно высоких значений – до 11-30 за один пассаж.



**Рис. 2.19** Влияние числа субкультивирований на коэффициент размножения *in vitro* у разных генотипов лаванды

Процесс размножения на втором этапе можно осуществлять неоднократно для получения необходимого числа растений, поэтому представляет значительный интерес изучение влияния количества субкультивирований на морфогенез меристемных культур. Это позволяет выяснить, как долго можно проводить размножение *in vitro* и как изменяются морфометрические параметры и коэффициент размножения по мере длительного культивирования. Установлено, что в

течение первых трех пассажей у изученных сортов и регенерантов происходило значительное увеличение числа дополнительных побегов, вследствие этого коэффициент размножения в третьем субкультивировании достиг максимального значения (рис. 2.19). Затем наблюдалось постепенное снижение этого параметра, а после седьмого субкультивирования его стабилизация на уровне 6-9, что было гораздо выше, чем в первом пассаже. Такая тенденция была продемонстрирована и для других сортов лаванды [76, 605]. Полученные данные свидетельствуют о возможности проведения у лаванды длительного (как минимум в течение двух лет) размножения *in vitro*, при сохранении на высоком уровне всех морфометрических показателей.

На примере некоторых других культур, в частности, вишни и сливы [122] тоже было показано, что с увеличением количества пассажей с первого по шестой происходило значительное увеличение коэффициента размножения. Анализ влияния длительности культивирования на микроразмножение некоторых эфиромасличных растений показал, что у шалфея и фенхеля в течение первых трех пассажей коэффициент размножения не изменялся, а затем постепенно снижался, тогда как у сортов герани эфиромасличной коэффициент размножения был стабилен в течение двух лет [63]. При микроразмножении сортов розы эфиромасличной в течение 9-ти субкультивирований было выявлено аналогичное повышение коэффициента размножения к 3-4-му пассажам [69]. У некоторых изученных видов семейства *Caryophyllaceae* максимальный коэффициент размножения отмечен в 3-м пассаже, а у *Ericaceae* и *Oleaceae* – в 4-5-м [143]. Для *Vaccinium corymbosum* L. показано, что лучшие параметры микроразмножения были в 4-м субкультивировании, однако после 5-го пассажа появлялись витрифицированные побеги [462].

В процессе изучения этапов микроразмножения выявлено заметное влияние генотипа на морфогенез меристемных культур. У сорта Синева отмечены более быстрые темпы развития меристем, высокая частота множественного побегообразования и большее число адвентивных побегов по сравнению с другими генотипами [67, 76, 605]. При размножении регенерантов на оптимизированных для сортов средах получены хорошие результаты, хотя многие показатели развития меристемных культур у них отличались, и иногда были ниже, чем у исходных сортов. Прежде всего, это касалось регенерантов, полученных из линий, устойчивых к осмотическому или низкотемпературному

стрессам. Возможно, это связано не только с эпигенетическими, но и с генотипическими особенностями регенерировавших из каллусов растений, среди которых могли быть и измененные соматональные варианты.

Низкая частота ризогенеза на средах для микроразмножения активизировала наши исследования в разработке 3-го этапа размножения – укоренения *in vitro*. При анализе различных модификаций сред с добавлением ауксинов (ИМК, ИУК, НУК), снижением концентрации сахарозы и солей определена оптимальная для этого этапа среда, содержащая 1,0 мг/л ИМК и половинную концентрацию макро- и микроэлементов МС, которая обеспечивала, в зависимости от сорта и цикла микроразмножения, укоренение до 87,5% побегов [66]. У сортов Синева и Степная при частоте ризогенеза 83-87% наблюдали формирование 2,9-6,4 корня на побег (рис. 2.18 Б). В некоторых работах также показано преимущество использования ИМК для укоренения *in vitro* побегов разных видов лаванды [303, 318, 370, 584]. Наряду с этим имеются сообщения о лучшем укоренении при введении в среду НУК [250, 327, 436], НУК и ИУК [600], или использовании безгормональной среды [288].

Процесс укоренения *in vitro* у лаванды длился 3-4 недели, после чего растения переводили в обычные условия выращивания. Адаптацию *in vivo* проводили первые 2-3 недели при повышенной влажности воздуха (90-100%) и температуре 20-24°C. Подобран субстрат для адаптации пробирочных растений – смесь торфа, перлита и керамзита (1:1:1). Используемые режимы адаптации к условиям *in vivo* обеспечивали приживаемость до 88-97% меристемных растений лаванды (рис. 2.18 В). В дальнейшем после адаптации их переносили в условия закрытого грунта (рис 2.20).

Методики микроразмножения, судя по имеющимся публикациям, разработаны для *L. officinalis*, *L. dentate*, *L. latifolia*, *L. angustifolia*, *L. viridis*, *L. vera*, *L. pedunculata*, *L. stoechas*, *L. spica*, лавандина [141, 155, 250, 303, 315, 327, 370, 453, 492, 600, 613]. Размножение разных видов *in vitro* проводили с использованием сегментов стебля с узлом [250, 315, 370, 492, 613], почек [125, 303, 327, 453, 555], эксплантов гипокотыля или листьев [288, 600]. При этом у *L. viridis* и *L. pedunculata* было показано преимущество введения в среду БАП [315, 613], у *L. officinalis* – БАП и ИУК [303], у *L. dentate* – БАП и ИМК [327], у *L. vera* и *L. angustifolia* – тиадазурина [370] или исключения гормонов из среды [353]. В ряде работ отмечена повышенная оводненность побегов, которую предлагали

снижать с помощью изменения концентраций гормонов, солей, агара [250, 370, 436, 613]. Некоторые исследователи на основании анализа размноженных *in vitro* растений лаванды по морфологии, хозяйственным признакам, составу эфирного масла [250, 613], и RAPD-анализу [600] констатировали их идентичность исходным формам. В то же время S. Echeverrigaray с соавт. выявили, что при размножении пазушными почками в течение шести месяцев у *L. dentate* развивались нормальные растения, а после года появилось небольшое количество морфологически измененных [327].



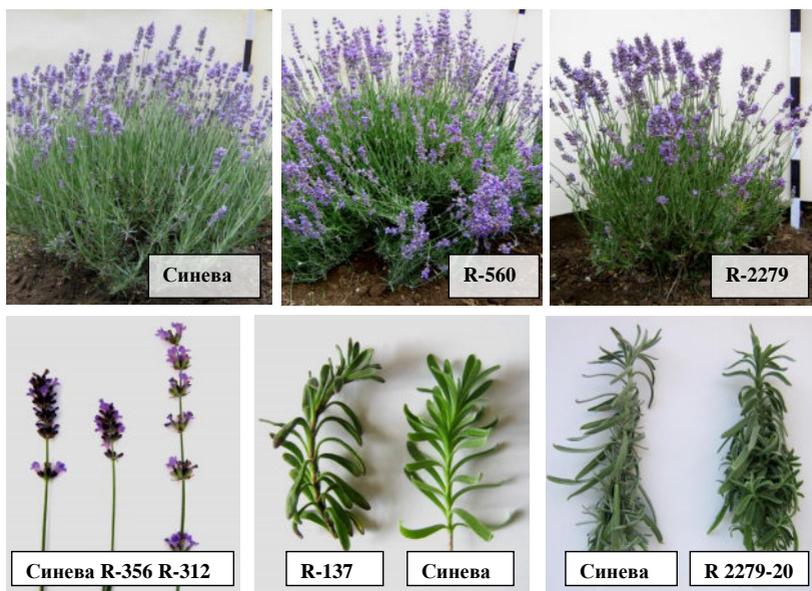
**Рис. 2.20** Регенеранты лаванды в условиях закрытого грунта (слева) и в полевых условиях в питомнике исходного материала (справа)

В результате проведенных исследований разработана методика микроразмножения [59], которая применялась для клонирования регенерантов лаванды, причем их размножение можно было начинать сразу со второго этапа, проводя микрочеренкование формирующихся из каллусов побегов.

## **2.9 Характеристика регенерантов лаванды по морфологии и некоторым хозяйственно ценным признакам**

В ходе экспериментов из каллусных культур лаванды сортов Степная и Синева получено более 220 регенерантов. После адаптации *in vivo* их пересаживали в почву и выращивали вначале в условиях закрытого грунта, а затем в поле, в питомнике исходного селекционного материала лаборатории селекции ФГБУН «НИИСХ Крыма» (см. рис. 2.20). Анализ вегетативного потомства полученных из каллусных культур регенерантов лаванды (3-5-й год вегетации) показал, что у большинства образцов была типичная для исходных сортов

морфология. Наряду с этим в популяции регенерантов отмечена вариабельность и отличия по сравнению с исходными сортами Синева и Степная по некоторым морфологическим и хозяйственно ценным признакам. Среди регенерантов из каллусов сорта Синева выявлено 24,1% образцов с морфологическими изменениями, а у сорта Степная – 21,3% образцов [64]. Изменения касались формы, окраски и размера листовой пластинки, формы куста, морфологии соцветия (длины соцветий, количества мутовок и цветков) и других признаков (рис. 2.21).



**Рис. 2.21** Изменчивость формы куста, соцветий, листьев и побегов у регенерантов лаванды, полученных из каллусов сорта Синева *in vitro*

У некоторых образцов появлялись укороченные междоузлия, «гофрированные» листья и утолщенные побеги с антоциановой окраской. Среди регенерантов, полученных из каллусов 5-7-го пассажей, часто встречались маложизнеспособные образцы с угнетенным ростом. Поэтому по количественным и хозяйственным признакам изучали регенеранты из каллусов 2-3-го пассажей.

При морфологическом анализе выделены образцы с повышенным числом цветков в мутовке – так, регенерант №2279-2 имел  $13,0 \pm 0,4$

цветков (у исходного сорта Синева –  $9,4 \pm 0,6$  шт.). Обнаружены регенеранты (№ 265-11 и 265-16) с увеличенным числом мутовок в соцветии (до 10,6 шт.) по сравнению с исходным сортом Степная (6,1 шт.). Выявлены раннеспелые регенеранты (№ 336-1 и 312), которые цвели на 10 сут раньше, и позднеспелый №2271-29, цветущий на 2 недели позже сорта Синева. Среди регенерантов были образцы, отличающиеся уровнем фертильности мужского гаметофита. У сорта Синева с фертильностью пыльцы 42,3% из каллусов получены регенеранты с повышенной до 82,0% фертильностью. В то же время показано снижение фертильности у № 402,4 (53,3%) и 265,13 (49,8%) по сравнению с исходным сортом Степная (90,3 %).

При анализе хозяйственно полезных признаков у регенерантов  $R_0$  и исходного сорта в течение 2007-2009 гг. выявлена широкая вариабельность по всем изученным признакам – размах изменчивости значений многих количественных признаков у регенерантов был больше, а коэффициенты вариации по всем признакам почти в 2 раза выше, чем у исходного сорта Синева (табл. 2.7). Наибольшую вариабельность у регенерантов имели признаки «число цветоносов на куст» и «масса соцветий» (коэффициент вариации более 40%). По всем признакам наблюдали сдвиг популяции регенерантов как в сторону уменьшения, так и в сторону повышения значений признака. Аналогичное повышение изменчивости регенерантов по сравнению с исходными генотипами отмечали и у некоторых других видов растений [47, 49, 179].

Судя по имеющимся литературным источникам, у некоторых видов лаванды также при регенерации из каллусных культур получены соматоклональные варианты [152, 586]. Так, из каллусов лавандина и сорта Рекорд получены регенеранты, отличающиеся от исходных генотипов по морфологии, содержанию эфирного масла и соотношению его основных компонентов [152]. В работе М. Tsuro с соавт. среди 63 изученных регенерантов *L. vera* обнаружены растения с морфологическими отклонениями, частота которых зависела от концентрации БАП в питательной среде. Содержание эфирного масла у всех регенерантов было меньше, чем у исходных растений, помимо этого выделены 3 образца с измененным составом эфирного масла [586]. Эти данные отличаются от наших результатов, поскольку у *L. angustifolia* среди регенерантов существенных изменений компонентного состава эфирного масла не установили, но при этом выделили ценные для селекции формы с повышенным его содержанием.

**Таблица 2.7 Характеристика регенерантов лаванды, полученных из каллусов сорта Синева, по некоторым количественным признакам\***

Признак	Сорт Синева		Регенеранты R <sub>0</sub>		
	X±Sx	V, %	Lim	V, %	максимальный % превышения сорта
Высота куста, см	61,8±2,5	8,2	48,5-68,0	10,3	10,0
Диаметр куста, см	67,2±5,1	15,1	48,7-92,0	22,3	36,9
Число цветоносов на куст, шт.	412,2±41,8	20,3	235,0-775,0	43,7	88,0
Длина соцветия, мм	51,5±1,9	7,5	42,3-90,4	25,4	75,5
Количество цветков в мутовке, шт.	9,4±0,4	8,5	6,9-14,1	19,7	50,0
Масса соцветий, г/куст	311,3±36,0	23,1	120,6-533,5	52,6	71,3
Фертильность пыльцы, %	42,3±2,3	11,1	19,2-81,0	41,7	91,4
МДЭМ на сырой вес, %	1,56±0,06	7,9	0,77-1,84	25,3	17,9
Содержание линалилацетата, %	31,4±0,6	4,2	22,7-33,9	12,8	8,0
Содержание линалоола, %	28,5±0,7	8,3	23,8-51,0	22,3	78,9

\*Растения выращивались на экспериментальном участке НИИСХ Крыма (пос. Крымская Роза Белогорского района).

Следует отметить, что среди регенерантов можно выделить образцы, превышающие исходный сорт, почти по всем признакам. По числу цветоносов и массе соцветий на куст 25-30%, а по МДЭМ – 42% регенерантов превосходили показатели сорта. Отобраны формы с высокой урожайностью (№ 312 и № 336-1), у которых по сравнению с сортом Синева было выше число цветоносов (соответственно на 88,2 и 55,0%) и масса соцветий (на 71,3 и 54,3%). Из каллусов сорта Синева получены ценные образцы (№№ 358, 2279-2, 2279-10), которые превысили исходный сорт по МДЭМ соответственно на 45,3; 61,4 и 66,9%. А среди регенерантов из каллусов сорта Степная выделен образец № 402-6, превывивший почти в два раза этот сорт по МДЭМ. Выделенные перспективные регенеранты лаванды с хозяйственно ценными признаками включены в селекционный процесс.

Представленные в данном разделе исследования позволили разработать методики [59], а также комплексную систему (рис. 2.22) создания и размножения *in vitro* новых форм лаванды, отражающую широкие возможности применения разнообразных клеточных технологий у этого эфиромасличного растения.

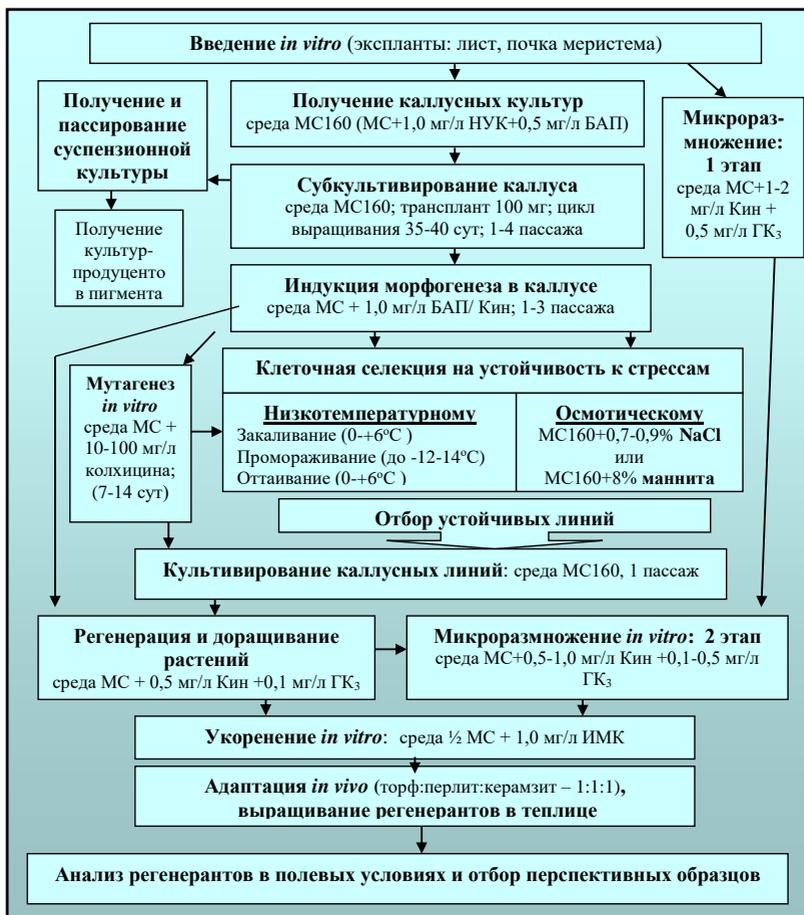


Рис. 2.22 Схема биотехнологической системы получения новых форм и микроразмножения лаванды *in vitro*

### ГЛАВА 3

#### КОРИАНДР ПОСЕВНОЙ (*CORIANDRUM SATIVUM L.*)

Одним из наиболее ценных эфиромасличных и пряно-ароматических растений, которое возделывается во многих странах мира, является кориандр посевной (*Coriandrum sativum L.*). В его плодах содержится до 2,6% эфирного и 18-28% жирного масла [151, 164]. Из эфирного масла кориандра получают его основной компонент – линалоол, а также цитраль, цитронеллол, гераниол и другие составляющие, используемые в парфюмерно-косметическом производстве. Кориандровое масло применяют для ароматизации пищевых продуктов, винно-водочных изделий, табака, а целые плоды используют как пряное сырье при изготовлении консервов, рыбных, хлебобулочных, кондитерских и ликероводочных изделий [123, 173]. Эфирное масло этого вида активно используется в медицине, так как оно обладает болеутоляющим, антисептическим, желчегонным, отхаркивающим и другими ценными свойствами [70, 276, 390, 434, 477]. Жирное масло кориандра применяют в текстильной, лакокрасочной промышленности, металлургии и мыловарении. Это растение является одним из лучших медоносов – с 1 га плантаций собирают до 500 кг меда.

Кориандр – однолетнее травянистое растение, относящийся к семейству Сельдерейных (Ariaceae). Стебель достигает высоты 150 см. Листья имеют различную форму и величину, в зависимости от расположения на побеге. Нижние листья собраны в прикорневую розетку. Мелкие, обычно белые цветки, собраны в соцветия – сложный зонтик, состоящий из 5-6 (иногда до 10) простых зонтичков. Плод – двусемянка, на внутренней поверхности каждой его половины располагаются два канала, в которых содержится эфирное масло. В фазе 4-6 розеточных листьев кориандр выдерживает температуру до -18°C, но в стадии стеблевания он погибает от заморозков. В период стеблевания – плодообразования очень чувствителен к обеспечению почвенной влагой и резко снижает урожай при высоких температурах и засухе [151, 173].

В ФГБУН «НИИСХ Крыма» на протяжении многих лет ведется работа по созданию сортов кориандра, включающая традиционные селекционные подходы, при этом исследования проводятся в пределах одного существующего вида *C. sativum*, что значительно сужает возможности получения исходного материала. Биотехнологические методы могут расширить генетическое разнообразие при использовании

соматональной вариабельности, мутагенеза *in vitro*, клеточной селекции. Для разработки таких клеточных технологий, прежде всего, необходимы хорошо воспроизводимые методы получения регенерантов в культуре *in vitro*.

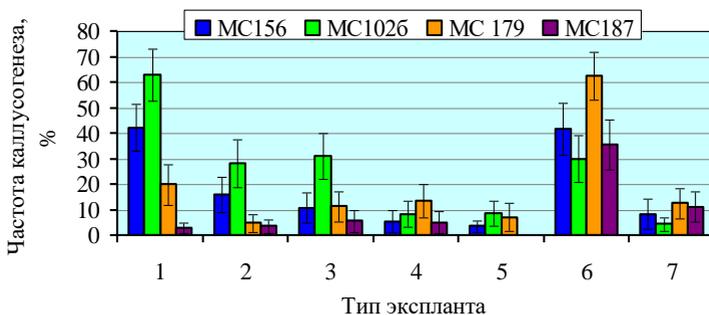
В литературе имеются публикации, свидетельствующие о возможности получения растений кориандра путем соматического эмбриогенеза при использовании различных эксплантов [406, 433, 543, 561, 609]. Показана возможность регенерации при культивировании изолированных протопластов двух сортов кориандра [244]. Во многих работах указывалось на влияние состава и консистенции питательной среды на созревание и прорастание зародышей [243, 406, 419, 433, 472]. Индукцию соматического эмбриогенеза часто применяли для микроразмножения *in vitro* или получения искусственных семян [300, 491, 560, 561]. Для *C. sativum* разработан протокол криосохранения соматических зародышей [506]. На примере культуры меристем кориандра исследовали феномен клонового старения при длительном субкультивировании. При этом было показано, что в условиях *in vitro* происходило не только омоложение, но и накопление возрастных изменений, что свидетельствует о необходимости периодического обновления культур [402].

Вместе с тем количество публикаций по культуре тканей этого вида невелико, также практически отсутствуют сведения о разработках клеточных технологий, способствующих расширению генетического разнообразия. В этой главе представлены данные об исследовании влияния различных факторов на процессы каллусогенеза и регенерации *in vitro* с целью разработки биотехнологических приемов создания новых форм кориандра. В экспериментах использовали сорта Янтарь, Ранний, Нектар, Медун (включенные в «Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию» [39]), Мисхор, Смена и селекционные образцы №№ 5248-5, 9197,9, 3750, 5955, 397-04, 399-04, 103, R-2746.

### **3.1 Индукция каллусогенеза и анализ динамики цитофизиологических параметров в цикле выращивания популяции каллусных клеток**

Установлено, что все испытанные типы эксплантов из вегетативных (сегменты стеблей и высадки листьев) и генеративных органов (соцветия, завязи, зародыши) растений способны образовывать каллус при

культивировании *in vitro*. Морфологические особенности каллусной ткани и частота ее индукции зависели от типа экспланта и состава питательной среды (рис. 3.1). Из сегментов стебля через 2 недели после введения начал формироваться плотный бежево-зеленый каллус с частотой до 62,5 %. Каллус из листовых эксплантов на испытанных средах развивался гораздо реже – с частотой до 12,5 %. Каллус листового происхождения отличался слабой пролиферацией, имел светло-коричневый цвет и быстро темнел. При эксплантации на питательные среды соцветий и завязей через 3-4 недели из нижней части завязи начинал формироваться бежево-желтый рыхлый распадающийся на отдельные участки каллус, частота образования которого у сорта Янтарь достигала на отдельных средах 62,8 % (см. рис. 3.1). Формирование каллуса из зародышей было достаточно редким событием.



**Рис. 3.1 Влияние типа экспланта и питательной среды на частоту индукции каллусогенеза у кориандра сорта Янтарь.**

Тип экспланта: 1 – молодые соцветия; 2 – зрелые соцветия; 3 – молодые завязи; 4 – зрелые завязи; 5 – зародыши; 6 – сегменты стебля; 7 – высечки листа. Добавки гормонов и к.г. в среде МС (мг/л): МС156 – БАП (0,5)+ 2,4-Д (0,5); МС 1026 – БАП (0,5)+2,4-Д (0,5)+ к.г. (500,0); МС 179 – НУК (2,0)+ БАП (1,0); МС187 – НУК (2,0)+ Кин (1,0)

Следует отметить, что в первичном каллусе из генеративных органов иногда наблюдали эмбриогенные зоны с белыми глобулярными структурами диаметром до 1 мм. Наряду с эмбриогенным каллусом, из генеративных органов изредка развивался неэмбриогенный плотный каллус светло-желтого или зеленого цвета. Его образование происходило из завязи, но чаще всего – из основания цветоножки. На одном соцветии можно было наблюдать индукцию эмбриогенного и неэмбриогенного каллуса. Однако основная часть эксплантов формировала эмбриогенный каллус (табл. 3.1).

**Таблица 3.1 Влияние генотипа на индукцию каллусогенеза и формирование проростков при культивировании молодых соцветий кориандра**

Сорт, образец	Частота формирования каллуса, %		Частота образования проростков, % от числа эмбриогенных каллусов
	всего	в том числе эмбриогенного	
Янтарь	61,1±6,2	43,5±5,1	25,0±2,3
Мисхор	75,0±5,7	52,2±5,2	33,3±4,5
Ранний	17,5±2,4	13,7±3,0	27,3±4,4
Смена	25,2±2,5	17,3±2,5	22,2±3,1
№ 5248-5	13,6±3,7	13,6 ± 3,1	66,7±4,9
№ 9197,9	56,7±6,0	50,0±5,9	16,7±2,2
№ 3750	47,2±5,8	34,0±4,9	27,8±3,9
№ 5955	16,7±3,1	11,1±2,9	0

Установлено, что индукция формирования каллуса, особенно эмбриогенного, в значительной степени зависела от состава питательной среды. В предварительных экспериментах показано, что у сорта Янтарь максимальная частота формирования каллуса из соцветий (способного в дальнейшем к эмбриогенезу) наблюдалась на средах, содержащих по 0,5 мг/л 2,4-Д и БАП. Добавление гидролизата казеина способствовало достоверному повышению частоты каллусогенеза по сравнению со средой, не содержащей этой добавки. На среде МС1026 максимальную частоту каллусогенеза отмечали не только при использовании в качестве эксплантов молодых соцветий, но и других генеративных органов (см. рис. 3.1). Эта питательная среда была эффективна для индукции образования эмбриогенного каллуса и у других сортов и образцов кориандра.

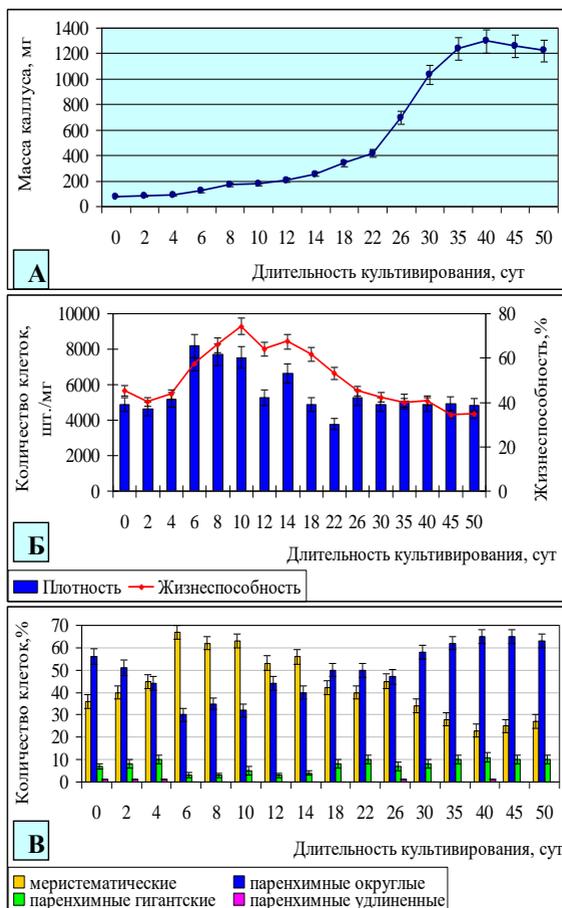
При сравнении разных типов эксплантов показано, что высокой частотой каллусогенеза на большинстве питательных сред обладали сегменты стебля (см. рис. 3.1). Однако, как показали дальнейшие исследования, при пассировании каллусов, полученных из вегетативных органов (стеблей и листьев) на испытанных модификациях питательных сред не происходила индукция морфогенеза. Только каллусы из генеративных органов, начиная с нулевого или первого пассажа, на некоторых средах проявляли способность к индукции соматического эмбриогенеза и развитию проростков.

Для многих клеточных технологий необходимы длительно пассируемые каллусы, поэтому важно подобрать питательную среду,

обеспечивающую их активную пролиферацию. На основании анализа влияния 21 модификации среды МС на прирост массы каллуса из соцветий сорта Янтарь показана необходимость введения в питательную среду для пассирования каллуса кориандра, как ауксина, так и цитокинина. На безгормональной среде или при введении только НУК, 2,4-Д, БАП ростовые индексы были в пределах 1,7-5,2. Увеличение массы каллуса отмечали при добавлении в среду в качестве ауксина НУК, а в качестве цитокинина – БАП или Кин. Максимальные, достоверно не различающиеся, ростовые индексы каллуса (от  $9,6 \pm 0,5$  до  $11,7 \pm 0,8$ ) были на средах, дополненных 2,0-3,0 мг/л НУК и 0,5-1,0 мг/л БАП или Кин.

Исследование динамики цитофизиологических показателей популяции каллусных клеток в цикле выращивания кориандра проведено на примере неморфогенного каллуса 8-го пассажа сорта Янтарь, полученного из соцветий. Анализ представленных на рис. 3.2 показателей позволил установить длительность основных фаз ростового цикла. Для кориандра характерен достаточно продолжительный латентный период (6-8 сут), после которого достоверно повышалась масса каллуса. После этого популяция вступала в фазу экспоненциального роста, что сопровождалось увеличением пролиферативной активности и, как следствие, – значительным повышением количества меристематических клеток, плотности и жизнеспособности. Через три недели культивирования начиналась линейная фаза, о чем свидетельствует резкое возрастание массы каллуса, а также повышение количества клеток на единицу массы. Судя по незначительному увеличению числа меристематических клеток, прирост массы каллуса происходил в этот период, главным образом, за счет растяжения клеток.

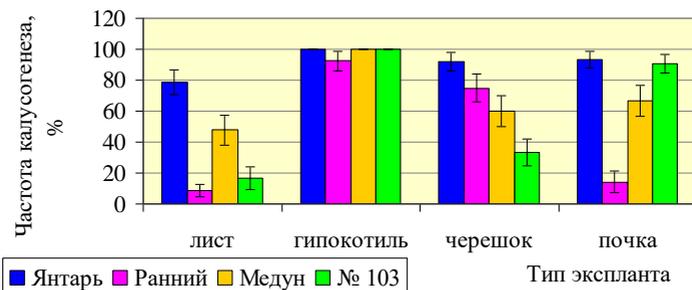
Переход популяции каллусных клеток в стационарную фазу начинался на 35-е сут, после этого не наблюдали достоверного прироста массы, которая за цикл выращивания увеличилась почти в 15 раз. Каллусная ткань состояла, в основном, из округлых паренхимных и меристематических клеток, соотношение которых менялось на протяжении цикла выращивания. Удлиненных клеток почти не было, а число гигантских паренхимных не превысило 8-10%. Полученные данные свидетельствуют о том, что продолжительность пассажа должна составлять не более 40-45 сут, так как после этого начинается фаза деградации и снижение жизнеспособности клеточной популяции.



**Рис. 3.2** Динамика изменения массы каллуса (А), плотности и жизнеспособности клеточной популяции (Б) и соотношения различных типов клеток (В) в цикле выращивания каллуса кориандра

У многих видов растений, в том числе и у кориандра, в качестве эксплантов исследователи использовали различные органы проростков, развившихся из семян *in vitro*, так как это более удобно и во многих случаях способствовало лучшей индукции морфогенеза [385, 406, 472, 533]. Поэтому проанализировали формирование каллусных культур у четырех сортов кориандра при эксплантации сегментов листа, черешка,

гипокотилия и почки из 2-3-х недельных проростков, выращенных в асептических условиях из семян. Полученные данные свидетельствуют о существенном влиянии генотипических особенностей и экспланта на индукцию каллусогенеза (рис. 3.3). Максимальная частота каллусогенеза (92,4-100%) отмечена при введении в культуру сегментов гипокотилия. Из этого экспланта формировался бежевый каллус с хорошим приростом, в котором при культивировании формировались зеленые меристематические зоны.



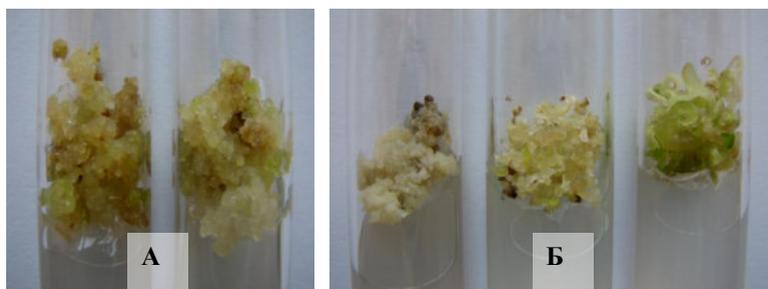
**Рис. 3.3 Частота каллусогенеза из разных типов эксплантов кориандра, выделенных из проростков, полученных *in vitro***

Из эксплантов листа каллус образовывался с меньшей частотой, при этом он характеризовался слабым приростом при дальнейшем пассировании. Наименьшая способность к каллусообразованию отмечена у сорта Ранний и №103 при эксплантации на питательную среду листа или почки. Каллусы разных сортов кориандра, полученные из органов проростков, чаще всего были рыхлыми, местами распадающимися на конгломераты, светло-бежевого цвета, иногда с зелеными зонами.

### 3.2 Особенности индукции соматического эмбриогенеза и развития проростков в каллусных культурах кориандра

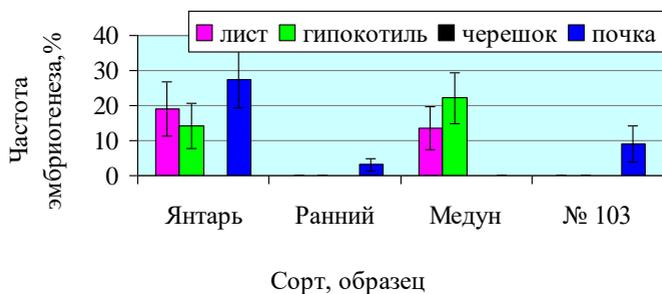
Формирование эмбрионного каллуса у *C. sativum*, судя по литературным данным, происходило при использовании разных эксплантов – завязей [543], сегментов гипокотилия или зародыша [406, 472], черешков листа [609], междоузлий и апексов стебля [419]. В наших исследованиях для различных сортов кориандра показана возможность индукции соматического эмбриогенеза в каллусных культурах, полученные из соцветий и завязей, а также из органов проростков [58].

Для стимуляции морфогенеза каллусы, индуцированные из сегментов гипокотыля, листа, черешка и почек, переносили на среды с добавлением 0,5-2,0 мг/л БАП, Кин, ГК<sub>3</sub>, НУК. Через 2-3 недели на поверхности каллусов иногда наблюдали появление глобулярных структур, представляющих различные стадии развития зародышей, из которых в дальнейшем развивались проростки (рис. 3.4). Формирование эмбрионных каллусных культур происходило на среде МС, дополненной 0,5-1,0 мг/л БАП. Частота соматического эмбриогенеза в значительной степени зависела от генотипа, типа экспланта и состава среды (рис. 3.5). Высоким морфогенным потенциалом обладал сорт Янтарь, у которого три типа эксплантов проявили способность к формированию соматических зародышей в пассируемом каллусе. У остальных сортов частота эмбриогенеза и количество компетентных эксплантов были ниже. Максимальная частота соматического эмбриогенеза (до 27%) отмечена у каллусов, образовавшихся из гипокотыля.



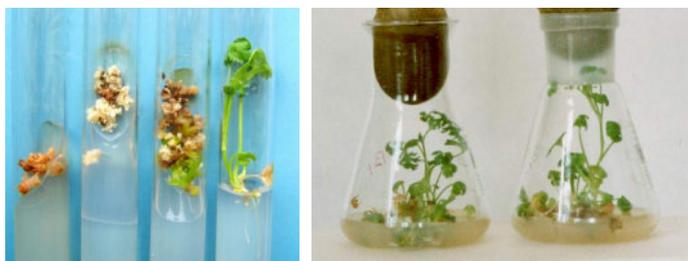
**Рис. 3.4 Индукция каллусогенеза (А) и соматического эмбриогенеза (Б) из эксплантов гипокотыля кориандра сорта Янтарь**

Полученные данные свидетельствуют о возможности использования у кориандра ювенильных органов проростков для получения эмбрионных каллусных культур, что может упростить методику регенерации растений. Однако, в целом, морфогенетические потенции органов проростков были гораздо ниже, чем у соцветий, поэтому в дальнейших исследованиях в качестве эксплантов преимущественно использовали молодые соцветия.



**Рис. 3.5** Влияние типа экспланта и генотипа на индукцию соматического эмбриогенеза из каллусов, полученных из органов проростков кориандра

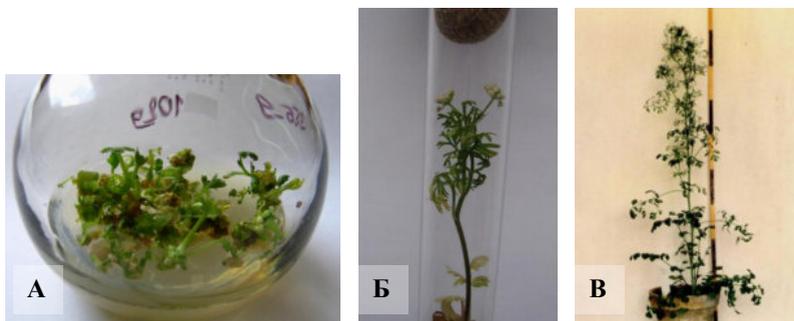
При эксплантации на питательную среду соцветий, как уже указывалось, в формирующемся каллусе происходила индукция соматического эмбриогенеза, а впоследствии развивались проростки и регенеранты (рис. 3.6, 3.7). Цитологический анализ эмбрионных каллусных культур показал большое количество локальных скоплений меристематических клеток, трахеидных элементов, а также многоклеточных соматических зародышей на различных стадиях развития (рис. 3.8). Такое асинхронное развитие эмбриоидов в каллусе характерно для многих видов растений.



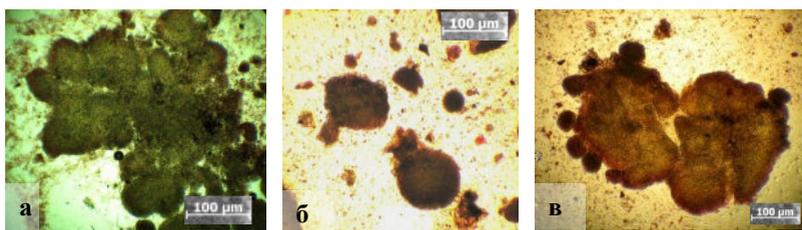
**Рис. 3.6** Индукция эмбрионного каллуса (слева) и развитие проростков (справа) из эксплантов соцветий кориандра сорта Янтарь

Генотип является одним из основных факторов индукции морфогенеза в культуре *in vitro* у многих видов растений [94, 112, 134]. В ряде работ убедительно показано наличие генетического контроля этого

признака [90, 224]. Для кориандра также продемонстрирована важная роль в индукции морфогенеза генотипических особенностей (см. табл. 3.1). У всех изученных сортов и селекционных образцов наблюдали индукцию эмбрионного каллуса, при этом максимальная частота его формирования отмечена у сорта Мисхор (52,2%), а минимальная – у № 5955 (11,1%).



**Рис. 3.7 Развитие вторичных эмбрионов и проростков в длительно пассируемом каллусе (А), цветение регенеранта *in vitro* (Б), регенерант кориандра сорта Янтарь *in vivo* (В)**



**Рис. 3.8 Формирование эмбрионной массы (а), глобулярных зародышей (б), вторичных эмбрионов (в) в каллусе кориандра**

При использовании в качестве донорных растений полученных ранее регенерантов наблюдали варьирование частоты индукции эмбрионного каллуса по сравнению с исходным сортом. Так, у регенерантов №№ 3451-1, 3452-1 этот показатель был ниже (12,5 и 30,4%), чем у сорта Янтарь (42,9%). В то же время у №№ 3252-6 и 3275-1 частота каллусогенеза повышалась соответственно до 62,3 и 70,6%. Следовательно, среди регенерантов кориандра можно отбирать образцы с

повышенной способностью к индукции соматического эмбриогенеза. Выявленные различия по частоте соматического эмбриогенеза у сортов и образцов кориандра, по-видимому, обусловлены генетической детерминацией этого процесса.

Морфологический анализ эмбрионных каллусов в течение длительного культивирования показал, что в первых трех пассажах происходил интенсивный прирост каллуса, в котором на 200 мг биомассы развивалось в среднем до 22 эмбриоидов размером 0,7-1,0 мм (табл. 3.2). В следующих 4-6-м пассажах прирост каллуса снижался (Р.И. 7-9), а количество соматических зародышей увеличилось до 34-42 штук. При цитологическом анализе, начиная с третьего пассажа, на поверхности многих соматических зародышей наблюдали формирование 5-10 небольших глобулярных вторичных эмбриоидов (см. рис. 3.8.в). В течение длительного культивирования эмбрионного каллуса интенсивность его пролиферации снижалась, и происходило асинхронное развитие первичных и вторичных эмбриоидов.

**Таблица 3.2 Влияние пассажа на развитие эмбриоидов в эмбрионном каллусе и регенерацию проростков у кориандра сорта Янтарь**

№ пассажа	Количество эмбриоидов / 200 мг каллуса, шт.		Количество проростков / 200 мг каллуса, шт.	
	всего	прорастающих	всего	нормально развитых
2	18,4±1,2	8,1±0,9	5,6±0,8	3,0±0,7
3	22,0±1,4	7,1±0,7	3,5±0,3	0,9±0,3
4	34,6±2,3	6,1±0,5	2,4±0,4	0,9±0,2
5	41,1±4,0	4,0±0,4	0,7±0,2	0,2±0,1
6	42,3±4,2	5,4±0,6	0,6±0,2	0,2±0,1

Установлено, что при культивировании эмбрионного каллуса прорастала лишь часть формирующихся эмбриоидов – 44,1% во 2-м пассаже; 32,1% – в 3-м пассаже; 20,3% – в 4-м пассаже (см. табл. 3.2). По мере дальнейшего пассирования количество прорастающих эмбриоидов снижалось до 10-15%, при этом каллусы сохраняли способность к образованию проростков до 1,5-2 лет. Однако с увеличением длительности культивирования происходило замедление прорастания зародышей и развития проростков. В каллусе 10-12-го пассажей среди формирующихся проростков было до 60-70% аномальных с недоразвитым корнем, и оводненными листьями, которые нельзя было использовать для адаптации *in vivo*. Изредка появлялись цветущие в

пробирках растения длиной 5-7 см с 1-3 зонтичками, в которых было до 10-15 цветков (см. рис. 3.7.Б). Однако цветки были аномальными, с редуцированными пыльниками, и образования плодов не происходило. В литературе имеются сообщения об индукции цветения *in vitro* у томатов, капусты, базилика, розы [247, 398, 520, 547]. При микроразмножении кориандра с использованием верхушек побегов R. Stephen и N. Jayabalan получили проростки с нормально развитыми цветками, а затем отметили формирование плодов [559].

Как видно из данных табл. 3.2 количество развивающихся эмбриоидов, и особенно частота образования проростков из эмбриогенных каллусов в несколько раз меньше, чем число зародышей. Это обусловлено, по-видимому, асинхронностью формирования соматических эмбриоидов в каллусной культуре, а также нарушением их нормального развития, вследствие чего часто образовывались тератологические побеги. Для некоторых видов растений также показано, что лишь часть соматических зародышей способна развиваться в нормальные проростки, что связано с нарушением нормального хода эмбриогенеза *in vitro* или же отсутствием подходящих условий для их развития [337, 373, 461]. Так, у картофеля лишь 50% соматических зародышей было способно к дальнейшему развитию [507], а у винограда не более 10% зародышей в каллусе развивались в проростки, а остальные формировали корни, листья или погибали [128].

В наших исследованиях установлено, что для дальнейшего развития эмбриоидов кориандра в проростки необходимо изменение состава питательной среды – исключение из ее состава 2,4-Д и введение НУК и БАП в более низкой концентрации 0,05 мг/л [58, 61]. Такое двухэтапное культивирование способствовало лучшему развитию зародышей, при этом в каллусной культуре формировалось до 30-50 визуально различимых зародышей. Снижение содержания регуляторов роста и исключение из среды 2,4-Д является важным методическим приемом, который у многих видов растений способствовал повышению эффективности развития и прорастания соматических зародышей [128, 134, 138, 337, 554, 609]. В работах по культуре тканей кориандра исследователи также использовали для стимуляции созревания зародышей и образования проростков снижение концентрации 2,4-Д и изменение содержания нитратов [433], снижение вдвое концентраций макро- и микроэлементов [472], или среду ½ МС с добавлением БАП [561].

В результате развития соматических зародышей в каллусе формировались проростки длиной до 35–45 мм, с корнем и 4-5 листьями, которые затем переносили в обычные условия выращивания в смесь торфа и перлита (1:1) и адаптировали с использованием традиционных приемов. Частота приживаемости регенерантов из каллусов 1-2 пассажей достигала 64,2%, а в последующих пассажах снижалась – в 3-4-ом до 46,2%, а в 5-м – до 33,3%. S.W. Kim с соавторами также указывали на невысокую приживаемость регенерантов кориандра *in vivo*, которая составляла 20% [406]. После 2-3 недель адаптированные растения переносили в вазоны с землей и выращивали в условиях закрытого грунта до получения семян (см. рис. 3.7.В). Разработанная методика регенерации позволяет получать растения-регенеранты кориандра из каллусных культур в течение 1,5-2 лет [61].

### **3.3. Исследование влияния низкотемпературного стресса на развитие каллусов и зиготических зародышей и разработка селективной системы для получения устойчивых форм *in vitro***

Одно из перспективных направлений селекции кориандра – создание сортов, пригодных для озимого возделывания, однако для этого необходим исходный материал, устойчивый к действию низких температур. Биотехнологические подходы, и в частности, метод клеточной селекции, позволяют получать генотипы, устойчивые ко многим абиотическим стрессам, в том числе и холодовому [37, 70, 121, 191, 268, 413, 527]. Поэтому проведено изучение действия низкотемпературного стресса на развитие изолированных культур кориандра с целью разработки селективной системы отбора устойчивых генотипов *in vitro*. При этом изучали возможность использования для отбора различных биотехнологических объектов – эмбрионных каллусов из соцветий и зиготических зародышей.

На первом этапе исследования проводили с использованием каллусных тканей. Для моделирования действия холодового стресса в холодильной камере проводили закаливание культур (при снижении температуры от +6 до 0°C в течение 6 сут), затем промораживание (при снижении температуры от 0°C до -12°C с различной экспозицией) и оттаивание (6 сут при повышении температуры от 0°C до +6°C). Испытаны 4 варианта промораживания: 1 – снижение температуры от 0 до -8°C (12 сут); 2 – от 0 до -10°C (14 сут); 3 – от 0 до -10°C (18 сут); 4 – от 0 до -12°C (14 сут). Контролем служили культуры, постоянно

выращиваемые при +26°C, 70%-ой влажности и освещенности 2-3 тыс. люкс с 16-часовым фотопериодом. После холодового стресса каллусы переносили на свежую питательную среду, культивировали при +26°C и в конце цикла выращивания определяли прирост каллуса, число соматических эмбриоидов и проростков (табл. 3.3).

**Таблица 3.3 Влияние холодового стресса и пассажа на развитие эмбриогенных каллусных культур из соцветий кориандра сорта Янтарь**

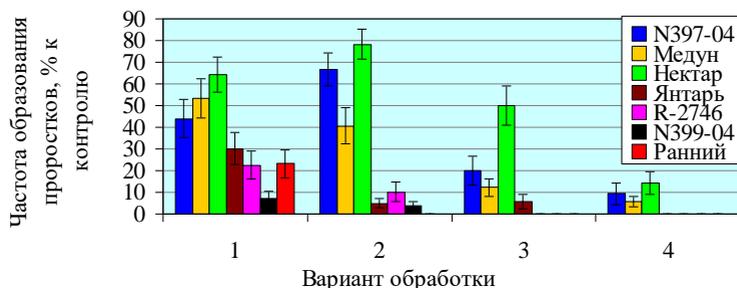
№ пассажа в опыте	Вариант холодовой обработки – режим промораживания	Прирост каллуса, балл	Кол-во прорастающих зародышей / 200 мг каллуса, шт.	Кол-во проростков / 200 мг каллуса, шт.
1	контроль	2,2±0,2	4,57±0,45	1,77±0,31
	1 – снижение t от 0 до -8°C (12 сут)	1,5±0,2	2,94±0,31*	0,71±0,18*
	2 – снижение t от 0 до -10°C (14 сут)	0,9±0,2*	1,41±0,51*	0,53±0,21*
	3 – снижение t от 0 до -10°C (18 сут)	0,4±0,1*	0,58±0,14*	0,17±0,10*
	4 – снижение t от 0 до -12°C (14 сут)	0	0	0
2	контроль	1,6±0,1	4,00±0,66	0,67±0,19
	2	1,4±0,3	4,28±0,78	0,78±0,31
	3	1,3±0,2	2,50±0,29	0,71±0,22
3	контроль	1,2±0,2	5,37±1,17	0,56±0,24
	2	0,9±0,2	6,75±0,87	0,56±0,15
	3	0,6±0,2	4,15±0,62	0,54±0,14

\*Различия с контролем достоверны при  $p \leq 0,05$

Установлено, что после первых трех вариантов промораживания происходило отрастание каллусных тканей, однако по мере увеличения дозы стресса прирост каллуса по сравнению с контролем снижался в 1,5-5,0 раз, а количество прорастающих эмбриоидов и проростков до 7-8 раз. Снижение температуры до -12°C вызывало почернение каллуса из-за летального эффекта. Сублетальной дозой стресса, по-видимому, является 3-й вариант, при котором наблюдалась пролиферация каллуса и небольшое число прорастающих зародышей. После 2-го и 3-го вариантов холодового стресса отобраны устойчивые к низкой температуре каллусные линии, которые в течение 2-3-го пассажей после промораживания в значительной степени восстанавливали пролиферацию. Количество прорастающих эмбриоидов и проростков у них достоверно не отличались от контроля.

Из отобранных устойчивых каллусных линий были получены регенеранты, однако многие из них характеризовались низким ростом, слабым развитием и стерильностью мужского гаметофита [70]. Это согласуется с литературными данными для других видов растений, свидетельствующими об угнетении развития регенерантов из устойчивых клеточных линий [14, 47, 48, 72, 117]. Вместе с тем у нескольких образцов были получены семена, которые использовались для дальнейших исследований и анализа устойчивости в полевых условиях.

В дальнейших экспериментах изучали возможность использования в качестве объекта для отбора *in vitro* изолированных зиготических зародышей [70, 77]. В исследования включили различающиеся по полевой зимостойкости генотипы – сорта Нектар, Медун и N397-04 с максимальной полевой зимостойкостью (соответственно, 91,3%, 98,0% и 100,0%), сорт Янтарь и образцы R-2746 и N399-04 со средней зимостойкостью (соответственно, 54,7%, 45,0% и 41,0%) и наименее устойчивый сорт Ранний (27,3%). Для этого изолированные из плодов зрелые зародыши после эксплантации на питательную среду подвергали холодовому стрессу с использованием четырех режимов промораживания (с предварительным закаливанием и последующем оттаивании). При анализе влияния низкой температуры на развитие эмбриокультур в качестве основного показателя использовали частоту образования проростков (рис. 3.9).



**Рис. 3.9 Влияние холодной обработки на частоту формирования проростков из зародышей *in vitro* у различных генотипов кориандра**  
 Варианты обработки: 1 – промораживание 0-8°C (12 сут); 2 – 0-10°C (14 сут); 3 – 0-12°C (20 сут); 4 – 0-12°C (27 сут).

Кроме того, определяли частоту прорастания зародышей, длину проростка, количество листьев, длину корня. Как видно из

представленных данных, снижение температуры и увеличение экспозиции при промораживании зародышей приводило к уменьшению частоты образования проростков и других показателей по сравнению с контролем у всех изученных генотипов. При этом проявилась зависимость между полевой зимостойкостью сорта и устойчивостью зародышей *in vitro* – чем выше зимостойкость сорта, тем меньше снижались изучаемые показатели по сравнению с контролем.

Так, во 2-м варианте холодной обработки у зимостойких образцов частота образования проростков составила 40,6-78,3% от контроля, у образцов со средней зимостойкостью этот показатель снизился до 3,8-10,2% (см. рис 3.9) [70]. У наименее устойчивого сорта Ранний формирования проростков в этом варианте не наблюдали.

Значения летальной и сублетальной температур также зависели от изучаемого генотипа. Чем выше зимостойкость сорта, тем в более жестких условиях эксперимента можно было получить проростки из изолированных зародышей. Как следует из представленных данных, 4-й вариант промораживания был сублетальным для наиболее устойчивых генотипов ('Медун', 'Нектар', N397-04), у которых при снижении температуры до -12°C получены единичные, нормально развитые проростки. Для сорта Янтарь сублетальным был 3-й вариант обработки, а для сортообразцов R-2746 и N399-04 – 2-й вариант. У менее устойчивого сорта Ранний сублетальным был температурный режим 1-го варианта обработки, в котором были получены проростки с частотой 23,1% от контроля. Чем выше была зимостойкость изучаемого генотипа, тем больше вероятность получения полноценных проростков при более жестких условиях промораживания зародышей *in vitro*. Выявлена достоверно высокая корреляция между полевой зимостойкостью генотипов кориандра и частотой прорастания зародышей (0,87-0,91), а также частотой образования проростков (0,76-0,94), особенно при 2-4-м вариантах холодного стресса (табл. 3.4). Наличие такой корреляции позволяет проводить отбор устойчивых форм, а, возможно, и тестирование на резистентность в условиях эмбриокультуры.

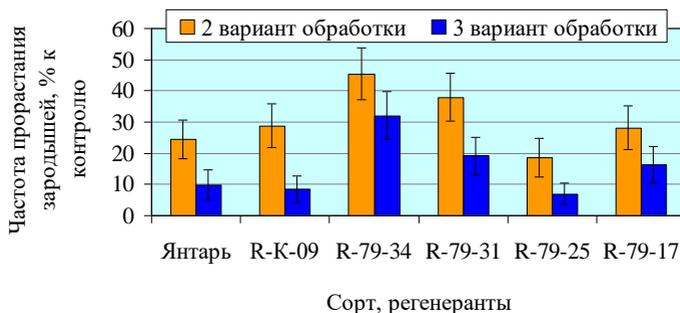
Отобранные в эмбриокультуре при действии холодного стресса образцы кориандра в дальнейшем переводили в обычные условия *in vivo*, где выращивали до получения плодов. С целью проверки устойчивости к низким температурам и проведения второго этапа отбора зародыши из этих образцов вводили в культуру *in vitro* и повторно подвергали низкотемпературному стрессу (при использовании 2 и 3-го режимов

промораживания). Как видно из представленных на рис. 3.10 данных, частота прорастания зародышей у регенеранта, полученного из исходной контрольной линии (R-K-09), почти не отличалась от этого показателя у исходного сорта Янтарь. Среди регенерантов из устойчивых линий выделены образцы R-79-34 и R-79-31, у которых частота прорастания зародышей после наиболее жесткого 3-го режима промораживания была в 1,7-3,2 раз выше, чем у исходного сорта [70]. Эти образцы адаптировали *ex vitro*, и у них было получено семенное потомство для дальнейших исследований.

**Таблица 3.4 Коэффициенты корреляции между полевой зимостойкостью и показателями развития зародышей кориандра *in vitro***

Вариант холодной обработки	Частота прорастания зародышей, %	Частота образования проростков, %	Длина проростка, см	Длина корня, см	Количество листьев, шт.
контроль	0,36	0,61	0,33	0,28	0,38
1	0,67	0,94**	0,09	0,42	0,40
2	0,87**	0,91**	0,50	0,48	0,55
3	0,91**	0,76*	0,65	0,64	0,72
4	0,88**	0,87*	0,66	0,62	0,65

Различия с контролем достоверны – \*при  $p \leq 0,05$ ; \*\*при  $p \leq 0,01$



**Рис. 3.10 Частота прорастания зародышей *in vitro* (% к контролю) у различных генотипов кориандра при холодной обработке**

Варианты обработки см. рис. 3.9

Экспериментальные данные показали эффективность проведения двухэтапного отбора [70], так как не все регенеранты, полученные из устойчивых каллусных линий, сохраняли признак устойчивости. Кроме

того, эти результаты могут косвенно свидетельствовать о сохранении признака устойчивости у отдельных растений, полученных из отобранных линий, и, следовательно, о возможности применения у кориандра таких приемов при создании исходного селекционного материала. В дальнейшем возможна разработка на основе селективной системы с использованием эмбриокультуры методики оценки селекционных образцов на устойчивость к низким температурам. Такой подход, например, применили для косвенной оценки пшеницы на устойчивость к заболеваниям – фузариозу колоса и альтернариозу [90].

Судя по имеющимся литературным данным, при разработке методов клеточной селекции на устойчивость к низким температурам авторы чаще всего для моделирования холодового стресса применяли обработку культивируемых объектов отрицательными температурами [37, 136, 268, 391, 437, 528], хотя иногда использовали и низкие положительные температуры [35, 274, 311, 592]. При этом в некоторых исследованиях отмечали важную роль в формировании устойчивости предварительного закаливания культивируемых тканей и органов [268, 527], введения в питательную среду АБК [437] или высоких концентраций сахарозы [268, 285].

В наших исследованиях установлены сублетальные режимы промораживания для каллусов и изолированных зародышей кориандра. При сравнении разных биотехнологических объектов следует отметить большую устойчивость эмбриокультур к холодовому стрессу, по сравнению с каллусами, которые выдерживали снижение температуры до  $-10^{\circ}\text{C}$ , тогда как у зиготических зародышей можно было проводить скрининг при промораживании до  $-12^{\circ}\text{C}$ . При моделировании холодового стресса мы использовали более продолжительные экспозиции промораживания зародышей (до 20-27 сут), по сравнению с применяемыми в ряде работ 1-3-мя сутками [285, 413, 437].

Выявленная корреляция между зимостойкостью изучаемых генотипов и показателями развития эмбриокультур свидетельствует о возможности проведения в условиях *in vitro* отбора форм, устойчивых к действию отрицательной температуры. На основе анализа полученных данных разработана схема и методика селекции кориандра *in vitro* [61]. При таком отборе на первом этапе используются полученные из соцветий эмбриогенные каллусы, из которых после низкотемпературной обработки отбирают устойчивые каллусные линии и получают растения. На втором этапе отбор устойчивых форм проводится после холодовой обработки эмбриокультур.

### 3.4 Анализ растений-регенерантов кориандра, полученных из эмбрионных каллусных культур

Важную роль при разработке клеточных технологий играет анализ полученных *in vitro* регенерантов, так как в зависимости от их генетической стабильности определяются пути использования регенерационной системы для получения новых форм, или ускоренного размножения. Особенно это важно при индукции соматического эмбриогенеза, который часто используется для микроразмножения, так как с большей вероятностью позволяет получать генетически стабильные растения по сравнению с органогенезом [26, 94, 138].

Полученные в каллусной культуре проростки кориандра после адаптации *in vivo* пересаживали в вазоны с землей и выращивали в теплице. В представленных в данной работе экспериментах проанализировано более 200 регенерантов  $R_0$ . Большая часть регенерантов ( $R_0$ ) по морфологии отличалась от исходного сорта Янтарь. В частности, не развивалась прикорневая розетка. Отмечено много низкорослых растений (в 3-4 раза ниже, чем исходный сорт) с меньшим количеством побегов, листьев и соцветий. У этих растений отмечены нарушения развития мужского и женского гаметофитов, что приводило к снижению в 5-10 раз числа завязавшихся плодов. До 20-30% растений имели тератологические цветки и недоразвитые тычинки и пестики, поэтому из них не были получены семена. Литературные данные также свидетельствуют о снижении фертильности регенерантов  $R_0$  у табака [26], кукурузы [224] и некоторых других видов [191, 192]. У элимуса 40,6 %, а у дикого риса 100% регенерантов были полностью стерильны [494]. Большинство аналогичных негативных изменений регенерантов  $R_0$  у кориандра, по-видимому, были эпигенетическими, так как они исчезали уже в следующем поколении, что характерно и для некоторых других видов растений [191, 192, 224].

Вместе с тем у кориандра получены регенеранты, представляющие интерес для селекции. Некоторые образцы имели типичную для сорта высоту, прикорневую розетку листьев и большое количество соцветий (см. рис. 3.7.В). Выявлены регенеранты  $R_0$  с более крупными плодами, а также «кустистые» формы, у которых развивался не один, а 2-3 центральных стебля. Для изучения наследуемых соматональных вариаций в полевых условиях проводился анализ семенного потомства регенерантов ( $R_1$ – $R_4$ ), который позволил выявить высокую гетерогенность потомства и ценные формы с хозяйственно полезными признаками. Среди семенного

потомства выделены образцы с измененной по сравнению с исходным сортом Янтарь высотой растения, формой куста или листьев, окраской и числом соцветий или побегов, сроком созревания плодов и другими признаками (рис. 3.11).



**Рис. 3.11** Изменчивость регенерантов кориандра, полученных из калусных культур. Исходный сорт Янтарь (1), регенеранты: R 2512/d76 (2); R 2820/d31 (3); R 2512/d31 (4); R 120-1/d96 (5); R 2512-/d6 (6)

При анализе хозяйственно ценных признаков также отмечена значительная вариабельность семенного потомства регенерантов (табл. 3.5).

Наряду с расширением пределов изменчивости, характерным для популяций регенерантов многих растений, выявлены образцы, превышающие исходный сорт Янтарь по массе плодов, урожайности и сбору эфирного масла, которые представляют интерес в качестве исходного материала для селекции. Так, по основному признаку – сбору эфирного масла некоторые регенеранты превышали сорт до 50-78%. Наличие широкого спектра вариабельности у полученных в культуре тканей растений продемонстрировано для многих сельскохозяйственных культур [16, 47, 49, 90, 179, 191, 224, 443].

**Таблица 3.5 Варьирование некоторых хозяйственно ценных признаков у регенерантов кориандра, полученных из каллусных культур (2002–2005 гг)**

Признак	Исходный сорт Янтарь	Регенеранты	
		Lim	% превышения сорта у лучших регенерантов
Высота растения, см	55,5±3,3	39,8 - 63,2	14,5
Количество зонтиков 1-го порядка, шт.	5,8±0,2	5,7 - 8,0	37,9
Количество плодов в зонтике, шт.	36,2±1,4	9,2 - 59,0	63,0
Масса плодов с 1 растения, г	0,84±0,10	0,16 - 3,29	291,7
Урожайность, г/делянки	42,3±5,5	8,2 - 80,0	89,1
Масса 1000 плодов, г	6,1±0,2	3,8 - 8,2	34,4
МДЭМ, % на сухой вес	2,56±0,05	1,91 - 2,86	11,7
Сбор эфирного масла, г/делянки	1,27±0,05	0,29 - 2,27	78,3

\*Растения выращивались на экспериментальном участке НИИСХ Крыма (пос. Крымская Роза Белогорского района).

Выявленная изменчивость полученных из каллусных культур регенерантов кориандра по ряду признаков свидетельствует о целесообразности применения индукции соматического эмбриогенеза для создания новых форм, а не ускоренного размножения. Хотя некоторые авторы предлагали использовать прямой соматической эмбриогенез из завязей у *C. sativum* для массового размножения растений [543] или для создания искусственных семян [560, 561, 300]. В результате наших исследований разработана комплексная биотехнологическая система создания новых форм кориандра, представленная на рис. 3.12, которая включает получение соматональных вариантов, а также клеточную

селекцию для отбора устойчивых к низким температурам форм. Предлагаемая биотехнологическая система апробирована на основных сортах кориандра, в результате были получены перспективные образцы, которые изучаются в селекционном процессе [106].

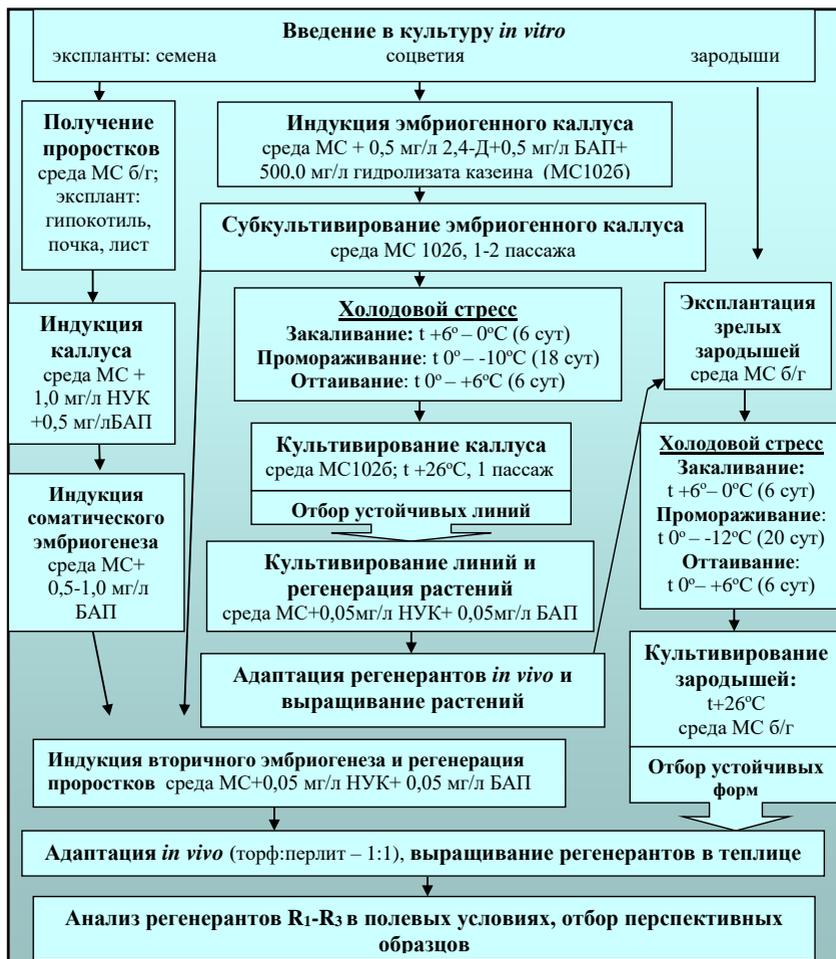


Рис. 3.12 Схема биотехнологической системы получения новых форм кориандра *in vitro*

## ГЛАВА 4

### ШАЛФЕЙ МУСКАТНЫЙ (*SALVIA SCLAREA* L.)

Шалфей мускатный (*Salvia sclarea* L.) относится к семейству Яснотковых (Lamiaceae), роду *Salvia*, включающему более 500 представителей, среди которых как эфиромасличное растение чаще всего используется *S. sclarea* [151, 173, 164]. Шалфей возделывается для получения эфирного и экстрактового масел, склареола и других продуктов [123]. В эфирном масле основными компонентами являются линалилацетат (70-75%) и линалоол (10-15%). Оно используется в парфюмерно-косметической и мыловаренной промышленности, в ликероводочном, кондитерском и табачном производствах. В медицине масло шалфея и водный экстракт (концентрат) применяют для лечения заболеваний верхних дыхательных путей, опорно-двигательного аппарата, периферической нервной системы, псориаза и других болезней [123, 165, 588, 504]. Большое внимание уделяется получению из сырья шалфея ценного продукта склареола, который применяется при изготовлении заменителей натуральной амбры (амбриала, амброксиды), а также лечебных кремов и мазей [123, 164]. Жирное масло из семян шалфея используется в керамическом и фарфоровом производстве, при изготовлении олифы.

Шалфей мускатный – многолетнее травянистое растение, которое в культуре обычно возделывается как двулетнее [164]. Стебель однолетний, мощный, прямой, травянистый, четырехгранный, который заканчивается соцветием. Листья у основания растения собраны в розетку, а на стебле располагаются супротивно. Листья крупные, жесткие, сильно опушенные, длинночерешковые, овальносердцевидной формы. Ближе к соцветиям листья постепенно уменьшаются и становятся сидячими. Колосовидное соцветие длиной до 40-70 см в виде ложной кисти, состоит из цветочных веточек, на которых в пазухах прицветников в виде полумутовок собраны цветки. Окраска венчика – от бледно-голубого до лилового цвета. На поверхности чашечки цветка размещается основное число экзогенных железок, в которых накапливается эфирное масло. Благодаря опушению листьев и стеблей, хорошо развитой корневой системе шалфей сравнительно легко переносит почвенную и воздушную засуху. Вместе с тем в условиях достаточного увлажнения образуется большее число цветоносов, что обуславливает более высокий урожай [123, 173].

С этим эфиромасличным растением в НИИСХ Крыма на протяжении многих лет проводится селекционная работа, в результате

которой созданы основные выращиваемые в нашей стране сорта [39, 164]. Тем не менее, для повышения эффективности селекции шалфея целесообразно дополнение традиционных методов современными биотехнологическими подходами. При этом уместно использование, прежде всего, клеточных технологий, способствующих расширению генетического разнообразия, а также клонального размножения [26, 94].

Разработка таких биотехнологий основана на оптимизации режимов культивирования тканей и органов *in vitro* и подборе условий индукции морфогенеза из эксплантов или каллуса. Для различных видов рода *Salvia* в последние два десятилетия проведены исследования, направленные на усовершенствование методов регенерации *in vitro* [357, 432, 440, 550, 568, 579] или разработку протоколов микроразмножения [328, 351, 359, 360, 439]. В отдельных работах выявлена возможность регенерации растений из каллусов путем органогенеза или соматического эмбриогенеза [385, 409, 432, 440, 550]. Имеются сведения о способности изолированных культур отдельных видов шалфея продуцировать вторичные метаболиты [252, 266, 302, 361, 377, 426, 533]. Однако в литературе почти нет данных о регенерации из длительно пассируемого каллуса и разработках клеточных технологий получения генетически разнообразного материала у *S. sclarea*. В данной главе представлены результаты исследований, касающихся различных вопросов индукции каллусо- и морфогенеза шалфея с целью разработки комплексной системы создания исходного селекционного материала и его размножения *in vitro*. В экспериментах изучали сорта С-785, Ай-Тодор, С-1122, Тайган [164] и селекционные образцы №№ 226, 2-01. Первые 2 сорта включены в «Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию» в РФ [39].

#### **4.1 Особенности индукции и длительного пассирования каллусных культур шалфея**

Необходимым этапом многих клеточных технологий является оптимизация условий получения и длительного выращивания каллусных культур. В предварительных опытах установлено преимущество использования в качестве базовой среды МС, дополненной регуляторами роста ауксинового и цитокининового типов. Показана возможность индукции каллусогенеза из эксплантов листьев растений, однако формирующийся каллус в дальнейшем проявил слабую способность к морфогенезу. Для получения исходных эксплантов более удобными и

доступными круглый год являются пробирочные растения, полученные из семян *in vitro*. Такой подход использовался у других видов растений, в том числе у *S. nemorosa*, *S. africana-lutea*, *S. officinalis* [385, 439, 533, 550]. Поэтому в нашей работе предварительно из семян на среде МС с 2,0 мг/л ИУК получали проростки, из которых через 3-4 недели вычленили сегменты листьев, семядолей, корней, гипокотилей, апикальные почки и микрочеренки с одним узлом. При культивировании этих эксплантов через 2-3 недели формировался каллус, частота которого в значительной степени зависела от состава питательной среды и типа экспланта (табл. 4.1).

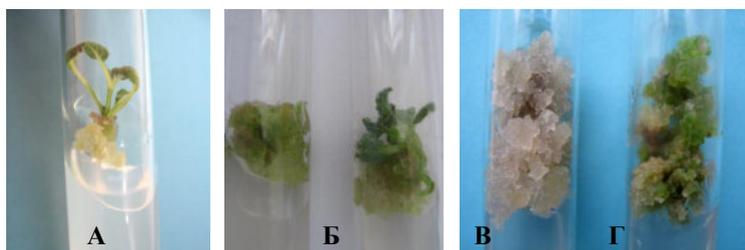
**Таблица 4.1 Влияние гормонального состава питательной среды и типа экспланта на частоту каллусогенеза у шалфея сорта С–785, %**

Гормональные добавки в среде МС, мг/л	Тип экспланта					
	корень	семядоля	лист	гипокотиль	почка	микрочеренок
НУК (1,0)	82,1±4,6	23,8±4,0	77,4±4,4	73,5±4,5	82,2±4,8	80,5±4,2
2,4,5-Т (1,0)	64,5±5,0	0	27,6±4,2	82,5±4,2	88,6±4,1	46,8±4,9
НУК (1,0)+ БАП (0,5)	92,8±3,8	96,3±2,9	100	84,4±4,6	100	98,4±2,8
2,4,5-Т (1,0)+ БАП (0,5)	13,3±2,9	0	36,6±4,8	24,5±4,2	86,4±4,4	10,2±2,0
Кин (2,0)+ ГК <sub>3</sub> (0,1)	0	0	2,4±1,3	31,5±4,1	61,6±5,1	37,5±4,2
Кин (0,5)+ ГК <sub>3</sub> (0,1)	6,5±2,0	0	3,2±1,3	9,6±3,0	55,7±5,4	16,8±3,8

Как видно из представленных данных, среды с введением одного ауксина (НУК, 2,4,5-Т) или цитокинина были менее эффективны, особенно для сегментов корня, семядоли и листа. У этих эксплантов не наблюдали каллусообразования, или его частота была минимальной. Добавление в среды НУК и БАП индуцировало активное формирование каллуса с частотой до 92,6-100%. При культивировании гипокотыля интенсивное каллусообразование отмечено не только при введении НУК и БАП, но и на средах с одним ауксином (НУК или 2,4,5-Т). У почек и микрочеренков происходило формирование каллуса на всех испытанных средах с частотой от 10,2 до 100,0%. При культивировании микрочеренков наблюдали каллусообразование в базальной части у основания черенка. Максимальная частота каллусогенеза (84,4-100%) у всех типов эксплантов была отмечена на среде МС с добавлением 1,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП.

Установлено, что на частоту индукции каллусогенеза значительное влияние оказывал тип экспланта, причем проявление этого признака зависело от состава питательной среды. В частности, у семядолей каллус образовывался только на средах с НУК и БАП, тогда как у других типов эксплантов добавление 2,4,5-Т или других регуляторов роста также приводило к каллусогенезу. Высокой способностью к каллусогенезу обладали почки и микрочеренки – у этих эксплантов каллус формировался на всех вариантах сред, как правило, с более высокой частотой и лучшим приростом, чем у других типов эксплантов (см. табл. 4.1).

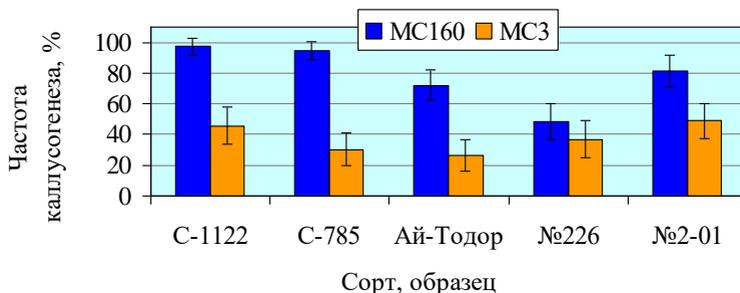
Каллусные культуры, полученные из разных типов эксплантов, различались по внешнему виду – на корнях и гипокотилиях наблюдали образование гомогенной, рыхлой, сильно оводненной каллусной массы белого цвета. На листьях и семядолях каллус был плотный, как правило, зеленого цвета. Каллус, полученный из почек и у основания микрочеренков, представлял собой рыхлую, гетерогенную клеточную массу светло-бежевого или светло-зеленого цвета с многочисленными ярко-зелеными меристемными зонами (рис. 4.1. А, Б), из которых в дальнейшем развивались почки.



**Рис. 4.1** Индукция каллуса из микрочеренка (А) и почки (Б); каллусы, выращиваемые в темноте (В) и на свету (Г), у шалфея сорта С-785

Исследование влияния генотипа донорного растения на образование каллуса показало, что большинство проанализированных сортов и образцов обладали хорошей пролиферативной активностью *in vitro*. При этом на проявление способности к каллусогенезу у разных генотипов существенное влияние оказывал гормональный состав питательной среды (рис. 4.2). Так, при индукции каллуса из листовых

эксплантов на оптимальной среде МС160 (МС+1,0 мг/л НУК+0,5 мг/л БАП) у сортов С-1122, С-785, Ай-Тодор и №2-01 частота каллусогенеза составила 72-97%, а у образца №226 она была достоверно ниже (48,4%). На среде МС3 с 1,0 мг/л 2,4,5-Т наименьшая частота каллусогенеза отмечена у 'Ай-Тодора' (26,5%).



**Рис. 4.2 Влияние генотипа на частоту индукции каллусогенеза из листовых эксплантов шалфея**

В предварительных экспериментах показано преимущество применения для субкультивирования каллуса шалфея питательной среды, которая использовалась для его индукции, при этом максимальное нарастание массы каллуса происходило к концу 4-й недели культивирования. Поэтому в дальнейшем мы пассировали каллусные культуры на среде МС160 через каждые 30 суток. Для *S. officinalis* В.М. Юриным с соавторами также было установлено, что стационарная фаза в цикле выращивания каллуса наступала на 28-30-е сут [231], хотя Ziga Volta с соавторами указывали на более продолжительный период – до 6 недель [612].

С целью оптимизации условий длительного субкультивирования каллусных тканей исследовали влияние пассажа и светового режима на прирост каллуса шалфея, полученного из листовых эксплантов. При культивировании каллусов сортов С-785 и С-1122 в течение 8-ми пассажей достоверных изменений ростового индекса не выявлено, этот показатель варьировал от  $10,3 \pm 0,8$  до  $12,1 \pm 1,0$ . Данный факт позволяет отнести каллус шалфея к первому типу изменчивости прироста биомассы каллусных штаммов, согласно предложенной В.А. Кунахом классификации [112].

Культивирование каллусов 6-го пассажа сорта С-785 при различных

режимах освещения показало, что в темноте ростовой индекс ( $11,1 \pm 0,7$ ) был достоверно выше, чем при освещенности 600 и 2000-3000 люкс (соответственно  $8,1 \pm 0,6$  и  $8,3 \pm 0,6$ ). При культивировании на свету каллус был компактным с зелеными участками, тогда как в темноте – более светлый рыхлый и оводненный (см. рис. 4.1 В, Г). Поэтому для получения большей массы каллуса у шалфея мускатного лучше использовать более экономное культивирование в темноте. Наши результаты в некоторой мере согласуются с полученными в работе румынских ученых данными о лучшем калусообразовании из эксплантов листа у *S. officinalis* при более слабом освещении [385]. Хотя Т. И. Дитченко не выявила различий у этого вида при анализе роста каллуса на свету и в темноте [45].

Судя по имеющимся литературным данным, у разных видов шалфея в качестве эксплантов для получения каллусных культур использовали верхушки побегов, почки [568, 612], листья [231, 385, 399, 409, 525] или сегменты междоузлий [534] асептических проростков. В нашей работе каллусы сортов *S. sclarea* были получены у шести типов эксплантов из проростков – корня, семядоли, листа, гипокотили, верхушки побега, микрочеренка. У большинства этих эксплантов оптимальная среда для каллусогенеза содержала 1,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП. Преимущество использования данных гормонов также показано в работе Ziga Volta с соавторами для *S. officinalis* [612]. Однако в ряде других исследований для этого вида рекомендуется введение в среду 2,4-Д и Кин [231, 385, 525], 2,4-Д и БАП [534] или ТДЗ [568]. Индукция каллусогенеза у *S. chamelaeagnea* была эффективна при добавлении в среду 2,4-Д [377], а у *S. fruticososa* – ТДЗ и ИУК [399]. Такая вариабельность состава сред для каллусообразования связана, прежде всего, с различными гормональными потребностями у используемых авторами генотипов и эксплантов шалфея.

## **4.2 Изучение закономерностей влияния различных факторов на морфогенез в каллусных культурах и оптимизация условий получения регенерантов**

Необходимым этапом исследований по разработке клеточных технологий является оптимизация режимов индукции морфогенеза в каллусных культурах. При изучении влияния типа экспланта и состава питательной среды на индукцию морфогенеза у шалфея сорта С-785 установлено, что морфогенез наблюдался только в каллусах, полученных из листьев, почек, семядолей и микрочеренков пробирочных растений

(табл. 4.2). У каллусов из корня и гипокотыля на испытанных средах морфогенных структур не наблюдали, а у листового и семядольного каллусов происходило только образование корней. В каллусных культурах, полученных из почек и микрочеренков, через 2-3 недели культивирования на морфогенных средах развивались почки, а затем формировались побеги без корней или с корнями, в зависимости от состава среды (рис. 4.3). При цитологическом анализе в этих каллусах выявлены соматические зародыши (преимущественно на ранних стадиях развития) и апексы побегов (рис. 4.4), что свидетельствует о наличии одновременно двух путей морфогенеза – органогенеза и соматического эмбриогенеза.

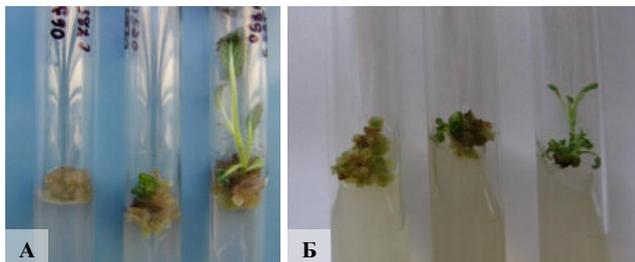
**Таблица 4.2 Дллияние состава питательной среды и типа экспланта на частоту морфогенеза в каллусе 1 пассажа у шалфея сорта С–785, %**

Гормональные добавки в среде МС, мг/л	Тип экспланта				
	семядоля*	лист*	гипоко- тиль; корень	почка**	микро- черенок**
БАП (1,0)	0	0	0	0	0
Кин (1,0)	0	20,3±4,0	0	4,2±1,9	2,2±1,1
БАП (1,0)+ГК <sub>3</sub> (0,5)	0	25,6±4,2	0	32,5±4,1	46,8±5,1
БАП (1,0)+Кин (1,0)+НУК (0,5)	62,5±5,1	0	0	24,8±4,3	19,5±4,0
Кин (1,0)+НУК (0,5)	21,5±4,1	0	0	6,8±2,1	21,6±3,9
НУК (0,5)+Зеатин (1,0)	0	0	0	0	0
БАП (0,5)+НУК (1,0)	0	0	0	48,4±4,9	58,6±5,1
БАП (1,0)+НУК (0,5)	0	0	0	3,6±1,4	15,4±2,9
Кин (0,5)+ ГК <sub>3</sub> (0,1)	0	0	0	84,5±4,2	94,2±2,5
Кин (1,0)+ГК <sub>3</sub> (0,1)	0	0	0	80,7±4,1	88,0±3,3
Кин (2,0)+ГК <sub>3</sub> (0,1)	0	0	0	72,6±4,8	82,7±3,7

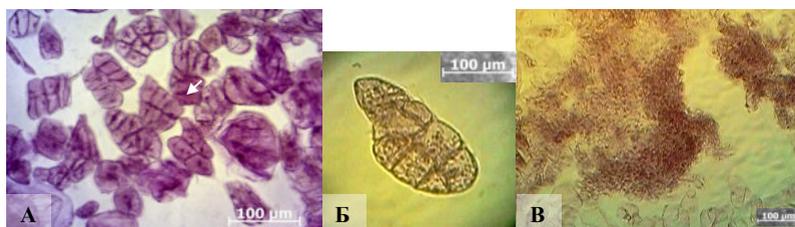
\*формирование корней, \*\* формирование побегов

Имеются литературные данные, свидетельствующие о разнообразии морфогенетических реакций в каллусных культурах шалфея. В работе О.М. Iola-Boldura с соавторами у *S. officinalis* на средах, содержащих НУК и БАП, или 2,4-Д и Кин, из молодых проростков индуцировали эмбрионный каллус [385]. Об индукции соматического эмбриогенеза у видов *Salvia* также сообщал S.E. Kintzios, при этом он указывал на стимулирующую роль низкой интенсивности света на этот процесс [409]. С другой стороны, в некоторых публикациях сообщалось о разработке методик регенерации растений путем органогенеза для каллусных

культуры, полученных из апексов или зиготических зародышей *S. officinalis* и *S. sclarea* [432, 568].



**Рис. 4.3** Индукция морфогенеза и регенерация побегов в каллусе, полученном из микрочеренка (А) и почки (Б), у шалфея сорта С-785



**Рис. 4.4** Индукция развития соматических зародышей (А), 12-ти клеточный проэмбрио (Б) и апекс побега (Б) в каллусах, полученных из почек, у шалфея сорта С-785

Индукцию морфогенеза в каллусе из почек или микрочеренков наблюдали на 9 из 11 проанализированных модификаций питательной среды МС с частотой от 2,2 до 94,2%. (см. табл. 4.2). Даже на оптимальной для каллусогенеза среде МС, содержащей 1,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП, в каллусах из этих эксплантов наблюдали морфогенез с частотой до 58,6%. Следует обратить внимание на широкий спектр сред, на которых была возможна индукция побегов в каллусах из почек и микрочеренков, – это среды с преобладанием цитокининов (используемые обычно для морфогенеза), а также среды с преобладанием ауксинов (типичные для каллусогенеза). Максимальная частота морфогенеза в каллусных культурах (до 84-94%) достигнута при введении в среду 0,5-1,0 мг/л Кин и 0,1 мг/л ГК<sub>3</sub>.

В литературе имеются сообщения об исследованиях у некоторых

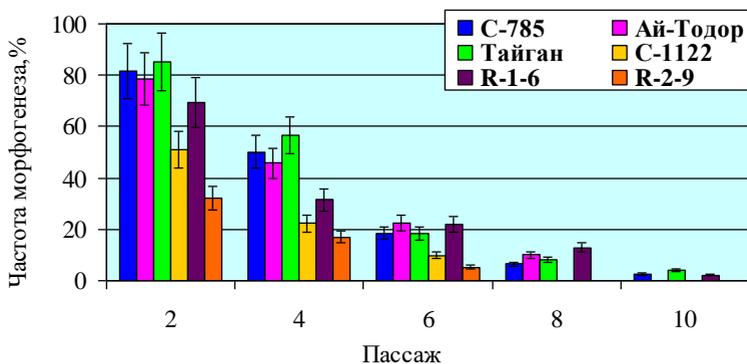
видов шалфея (*S. miltiorrhiza*, *S. nemorosa*, *S. sclarea*, *S. africana-lutea*, *S. officinalis*) процесса морфогенеза при использовании каллусов, полученных из эксплантов семядолей и гипокотыля [432, 439], стеблевых апексов [568], листьев и черешков пробирочных растений [385, 409, 550]. Эти исследования большей частью направлены на оптимизацию условий размножения *in vitro*. При этом в качестве гормональных добавок авторы добавляли в питательную среду БАП или этот цитокинин в сочетании с 2,4-Д, ИУК, НУК, ИМК [377, 432, 439, 550, 568]. В наших экспериментах у сортов *S. sclarea* каллусные культуры, способные к регенерации побегов, получены из почек или микрочеренков. Также показано преимущество введения в питательную среду Кин и ГК<sub>3</sub>, которые обеспечили частоту морфогенеза до 84-94%.

Актуальной проблемой при разработке многих клеточных технологий является сохранение морфогенетических потенций каллуса при длительном культивировании. Это связано с возрастающей генетической гетерогенностью культур по мере их пассирования и, следовательно, возможностью получения соматоклональных вариантов [112, 191]. В табл. 4.3 представлены данные о влиянии количества пассажей и состава питательной среды на частоту морфогенеза в каллусах, полученных из почек или микрочеренков сорта С-785. На изученных средах в каллусе наблюдали развитие побегов при достаточно длительном культивировании. Так, на среде с БАП и НУК – морфогенез наблюдали до 6-го пассажа, а на средах с Кин и ГК<sub>3</sub> – до 10-го пассажа. Максимальная частота индукции морфогенеза на всех средах отмечена в 1-3-м пассажах, затем, по мере культивирования, происходило снижение интенсивности этого процесса. Наибольшую частоту морфогенеза при культивировании каллусов, полученных из почек и микрочеренков, обеспечивала питательная среда МС, содержащая 0,5 мг/л кинетина.

Установлено, что у других генотипов шалфея (сортов Ай-Тодор, С-1122, Тайган и регенерантов R-1-6 и R-2-9) также формировались каллусные культуры, способные к длительной регенерации побегов из эксплантов почек. Представленные на рис. 4.5 данные свидетельствуют о существенном влиянии генотипических особенностей на морфогенетические потенции каллусных культур. Меньшей частотой морфогенеза отличались сорт С-1122 и регенерант R-2-9. При длительном субкультивировании у сорта С-1122 индукция морфогенеза наблюдалась вплоть до 6 пассажа, у 'Ай-Тодора' и R-2-9 – до 8-го пассажа. У сортов С-785, Тайган и образца R-1-6 морфогенетические способности сохранялись вплоть до 10-го пассажа.

**Таблица 4.3 Влияние пассажа, типа экспланта и состава питательной среды на частоту индукции морфогенеза в каллусной культуре шалфея сорта С-785, %**

Гормональные добавки в среде, мг/л	Тип экспланта	Пассаж				
		2	4	6	8	10
БАП(0,5)+ НУК(1,0)	почка	37,5±4,7	25,2±4,1	6,3±2,1	0	0
	микрочеченек	26,7±4,2	19,4±4,0	1,5±0,8	0	0
Кин(2,0)+ ГК <sub>3</sub> (0,1)	почка	72,6±4,6	51,8±5,1	19,4±3,7	4,4±1,9	1,2±0,5
	микрочеченек	94,5±2,8	62,6±5,0	21,3±4,1	12,6±3,1	5,5±2,1
Кин(0,5)+ ГК <sub>3</sub> (0,1)	почка	84,5±4,1	62,6±5,1	24,9±4,3	12,5±3,0	8,4±2,3
	микрочеченек	98,3±2,4	71,6±4,3	31,5±4,2	20,8±3,6	13,9±3,1



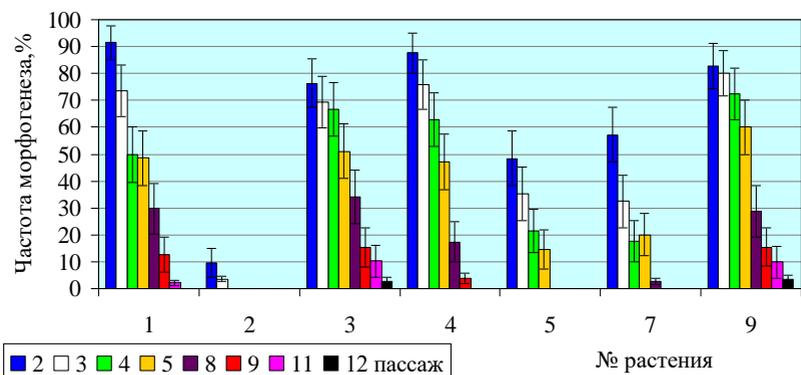
**Рис. 4.5 Влияние пассажа, сорта и образца на индукцию морфогенеза в каллусных культурах, полученных из почек у шалфея**

В наших исследованиях подобранные экспланты и питательные среды способствовали регенерации побегов из каллусов в течение 6-10 пассажей. В доступной литературе нет сведений о длительной регенерации в каллусных культурах не только у *S. sclarea*, но и у других видов шалфея. Только в работе А.А. Tawfik и М.Ф. Mohamed сообщалось о дифференциации побегов в каллусе *S. officinalis* в течение трех пассажей [568].

Шалфей является перекрестноопыляющимся растением и его сорта представляют собой гетерогенную популяцию. Поэтому было исследовано влияние генотипа индивидуального донорного растения (в пределах сорта) на частоту и продолжительность индукции морфогенеза в каллусных культурах. В эксперименте использовали каллусы, полученные из почек у семи исходных пробирочных растений сорта С-785, которые культивировали в течение 12 пассажей (рис. 4.6). Полученные результаты продемонстрировали существенную изменчивость индивидуальных растений шалфея по изученным признакам. Основная часть растений обладала высоким морфогенным потенциалом в течение всех изученных пассажей. Индукцию морфогенеза у растений №№ 1, 3, 4, 9 наблюдали с достоверно не различавшейся частотой (во 2-м пассаже 76,3-91,5%), которая постепенно снижалась по мере субкультивирования. При этом в каллусах растений № 3 и 9 почки и побеги формировались до 12-го пассажа, а у №№ 1, 4, 7 – соответственно до 11, 9 и 8-го пассажей. Каллусы растения № 2 характеризовались минимальной морфогенетической способностью – у них регенерацию с небольшой частотой наблюдали только во втором и третьем пассажах (соответственно 9,7 и 3,6%).

Аналогичные данные получены при изучении индивидуальных растений сорта Тайган и гибрида №2-01, у которых частота морфогенеза в каллусах варьировала от 0 до 78,8%. Выявленная закономерность, обусловленная генетической гетерогенностью в пределах сортов и гибридов шалфея, свидетельствует о возможности проведения отбора растений с повышенной морфогенетической способностью. Такой прием целесообразно использовать при работе с сортами, характеризующимися низкой частотой регенерации.

Регенерировавшие из каллусов побеги иногда имели корни (до 30-58%), но при их отсутствии для ризогенеза использовали питательную среду  $\frac{1}{2}$ МС с 1% сахарозы, содержащую 2,0 мг/л ИМК. На этой среде укоренялось, в зависимости от пассажа и генотипа, от 52 до 82% микропобегов. При увеличении пассажа частота укоренения проростков снижалась. Следует отметить, что из каллусов 5-10-го пассажей часто развивались тератологические или мало жизнеспособные проростки, поэтому для исследований обычно использовали регенеранты из 1-3-го пассажей. Полученные регенеранты шалфея с частотой 75-92% приживались в смеси торфа и земли (1:1) при переносе в обычные условия выращивания с применением традиционных приемов адаптации *in vivo* [94].



**Рис. 4.6** Влияние генотипа индивидуального донорного растения шалфея сорта С-785 и пассажа на индукцию морфогенеза в каллусных культурах, полученных из почек

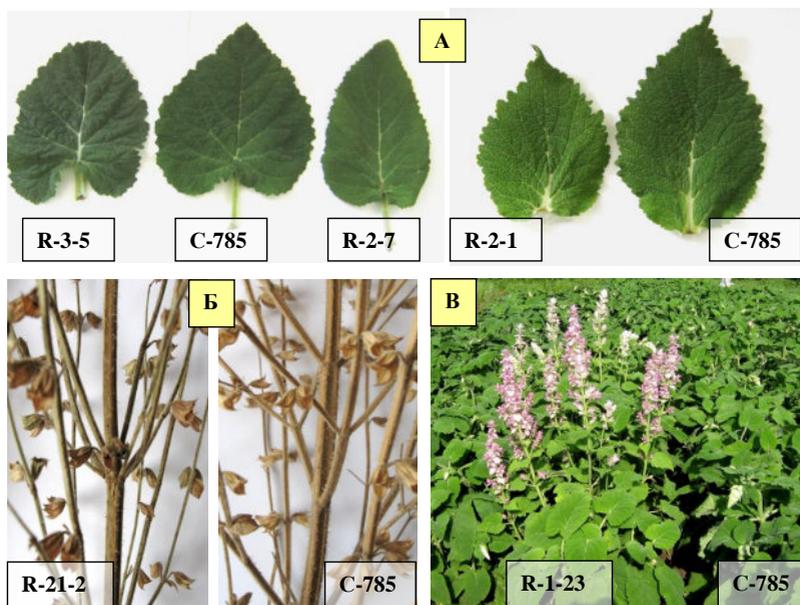
### 4.3 Характеристика регенерантов из каллусных культур по морфологии и некоторым хозяйственно ценным признакам

Разработка одной из относительно простых, но результативных клеточных технологий получения соматональных вариантов может быть эффективной при оптимизации методов регенерации из каллусных культур, а также детальном анализе регенерантов и их потомства. Растения-регенеранты ( $R_0$ ), полученные из каллусов 2-3-го пассажей шалфея сорта С-785, после адаптации переносили в полевые условия, где выращивали для получения семян после самоопыления (рис. 4.7). Начиная с 2006 г., на экспериментальном участке ФГБУН «НИИСХ Крыма» (Белогорский район, пос. Крымская роза) проводился анализ морфологических и хозяйственно ценных признаков семенного потомства этих регенерантов ( $R_1$ - $R_3$ ).

При визуальном анализе у регенерантов, наряду с растениями с типичной для исходного сорта морфологией, выявлено 12,5% образцов с морфологическими отклонениями по сравнению с исходным сортом С-785. Это проявлялось в изменении формы черешковых или сидячих листьев (например, №№ R-3-5; R-2-7; R-2-1), структуры соцветий (появилось ложно-мутовчатое ветвление у №№ R-21-2; R-21-4), окраски цветков или прицветников, размера куста, а также изменчивости некоторых других признаков (рис. 4.8). Выявлен раннеспелый образец № R-1-23, у которого цветение наблюдалось на 14 суток раньше сорта.



**Рис. 4.7** Адаптация регенерантов шалфея *in vivo* (А) и выращивание их в полевых условиях (Б)



**Рис. 4.8** Соматическая изменчивость у регенерантов, полученных из каллусов шалфея сорта С-785

Изменчивость морфологии листовых пластинок черешковых (слева) и сидячих листьев (справа) (А), ветвления соцветий (Б); раннецветущий регенерант R-1-23 (В)

Установлена значительная вариабельность регенерантов при анализе основных количественных признаков. В табл. 4.4 приведены некоторые параметры у регенерантов  $R_1$  в сравнении с исходным сортом.

Как видно из представленных данных, размах изменчивости у регенерантов по всем признакам был больше, чем у сорта С-785. Из всех изученных признаков более стабильными были высота растения, длина центрального соцветия и содержание линалилацетата (коэффициенты вариации 6,7-20,7%). Существенное варьирование наблюдали по количеству боковых ответвлений 2-го порядка и цветonoсных побегов, массе соцветий, массовой доле эфирного масла и сбору эфирного масла с растения (коэффициенты вариации от 40,2 до 171,1%). Большой размах изменчивости по этим признакам свидетельствует о высокой степени разнообразия полученных *in vitro* растений.

**Таблица 4.4 Варьирование некоторых количественных признаков у регенерантов шалфея (2006-2008 гг.)\***

Признак	Исходный сорт С-785	Регенеранты (R <sub>1</sub> )	
	X±S <sub>x</sub>	Lim	V, %
Высота растения, см	131,9±8,8	79,6 – 166,0	20,7
Длина центрального соцветия, см	60,2±1,7	22,3 – 74,3	18,9
Количество боковых ответвлений 2 порядка, шт.	11,9±1,9	0,0 – 19,3	171,1
Количество цветonoсных побегов, шт.	6,6±1,5	1 – 13	52,7
Масса соцветий, г/растения	593,2±74,7	90,8 – 1035,0	53,3
Массовая доля эфирного масла, %	0,25±0,04	0,08 – 0,47	40,2
Сбор эфирного масла, г/растения	2,01±0,80	0,04 – 2,46	74,6
Содержание линалилацетата в эфирном масле, %	55,3±3,8	46,6 – 63,1	6,7

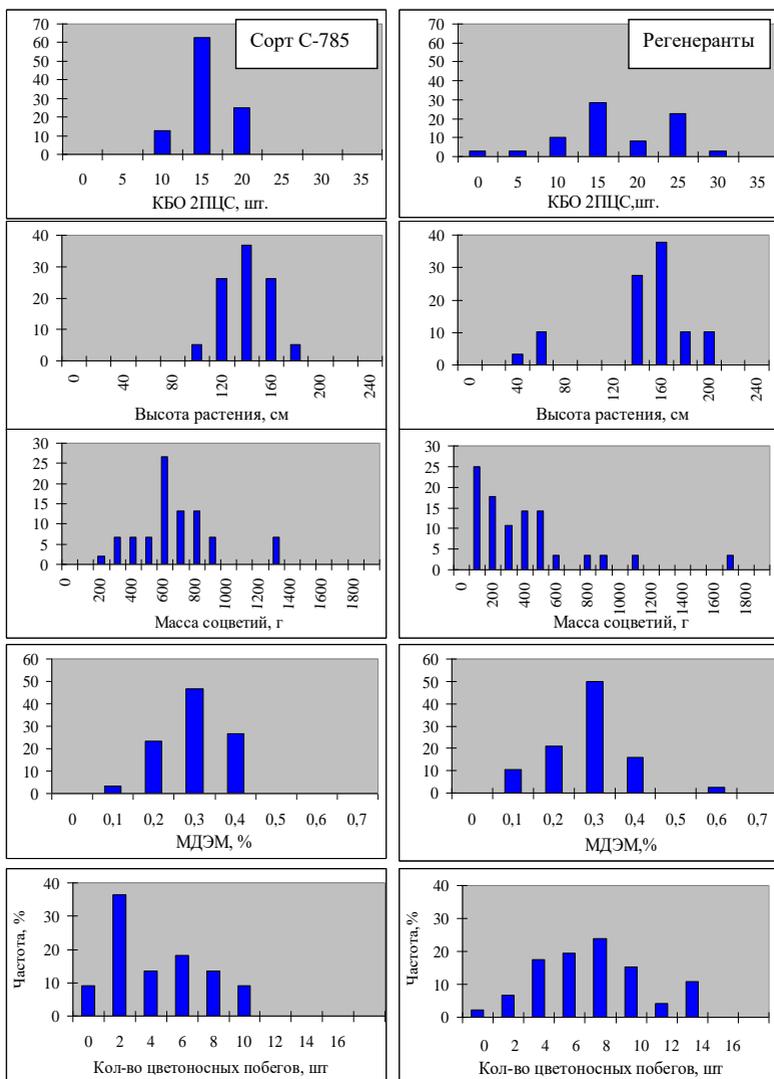
\*Растения выращивали на экспериментальном участке НИИСХ Крыма (пос. Крымская Роза Белогорского района)

По всем изученным признакам среди регенерантов были формы, как превосходящие сорт, так и уступающие ему. Так, масса соцветий у регенерантов колебалась от 90,8 до 1035,0 г/растения, тогда как у сорта С-785 этот показатель был на уровне 593,2 г/растения. Значительную изменчивость соматоклональных вариантов по хозяйственным признакам, как в отрицательную, так и в положительную сторону, также отмечали у кукурузы, пшеницы, ячменя, картофеля и других видов растений [16, 47, 49, 90, 179, 191, 224].

Сравнительный анализ данных у регенерантов R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub> (2006-2009 гг.) также показал больший размах изменчивости и увеличение коэффициентов вариаций количественных признаков у семенного потомства полученных из каллусов растений по сравнению с сортом С-785. Размах изменчивости, судя по коэффициентам вариации, в двух поколениях регенерантов был достаточно схожим.

Для изучения особенностей проявления соматклональной вариабельности в 2008 г. проведено сравнение распределения растений по некоторым количественным признакам в пределах исходного сорта шалфея С-785 и у регенерантов из каллусных культур (рис. 4.9). Такой анализ особенно интересен для перекрестно опыляемых культур, у которых как у шалфея, сорта представляют достаточно гетерогенную популяцию. Как видно из представленных гистограмм распределения, по всем признакам размах изменчивости у регенерантов значительно превосходил внутрисортную изменчивость, что особенно ярко проявилось на примере признака «количество боковых ответвлений 2-го порядка». При этом для некоторых признаков (масса соцветий, высота растений) отмечен сдвиг популяции регенерантов в сторону нижней границы значений показателя. Высокую частоту появления негативных вариантов у регенерантов отмечали также у кукурузы [47], эспарцета, сои, люцерны [179]. Для других признаков (например, количество цветоносных побегов), наоборот, происходило расширение пределов изменчивости за счет сдвига популяции в сторону верхней границы (см. рис.4.9). Однако при любом сдвиге популяции регенерантов (к верхней или нижней границе) по всем признакам можно выделить формы с более высокими показателями, выходящими за пределы изменчивости исходного сорта, которые и представляют интерес для селекции.

Проведенные исследования показали, что полученные в каллусной культуре регенеранты шалфея мускатного отличались значительной вариабельностью по морфологии и хозяйственным признакам, что свидетельствует о наличии у них соматклональной вариабельности и перспективности ее использования для селекции. Ранее в литературе мы не встречали аналогичных сообщений, касающихся регенерантов рода *Salvia*, хотя для ряда других видов растений имеется много сведений о получении соматклонов и их использовании при создании исходного селекционного материала и новых сортов [16, 17, 37, 49, 90, 179, 191, 443, 463, 519].



**Рис. 4.9** Распределение растений у сорта шалфея С-785 (слева) и регенерантов (справа) по количеству боковых ответвлений 2-го порядка на центральном соцветии (КБО 2ПЦС), высоте растений, массе соцветий, МДЭМ и количеству цветоносных побегов

В семенном потомстве ( $R_2$ - $R_3$ ) регенерантов шалфея были выделены перспективные образцы, превышающие не только исходный сорт С-785, но и последний внесенный в Государственный реестр сорт Тайган [39] по урожаю соцветий и сбору эфирного масла в 1,2-1,8 раз [201]. Эти образцы представляют ценный исходный селекционный материал. Перспективный сортообразец №  $R_3$ -1-6, наряду с двумя другими регенерантами, в 2014-2019гг. изучали в питомнике предварительного, а затем конкурсного сортоиспытания (рис. 4.10). Установлено, что в конкурсном сортоиспытании [200] в среднем за три цикла изучения сортообразец №  $R_3$ -1-6 превысил контроль (сорт Тайган) по урожаю соцветий на 24,9 % и сбору эфирного масла на 43,9 %. В 2020г. подана заявка на регистрацию нового сорта шалфея мускатного Селинж.



**Рис. 4.10** Питомник конкурсного сортоиспытания регенерантов шалфея мускатного (2020 г.)

#### **4.4 Разработка биотехнологических приемов селекции шалфея на устойчивость к осмотическому стрессу *in vitro***

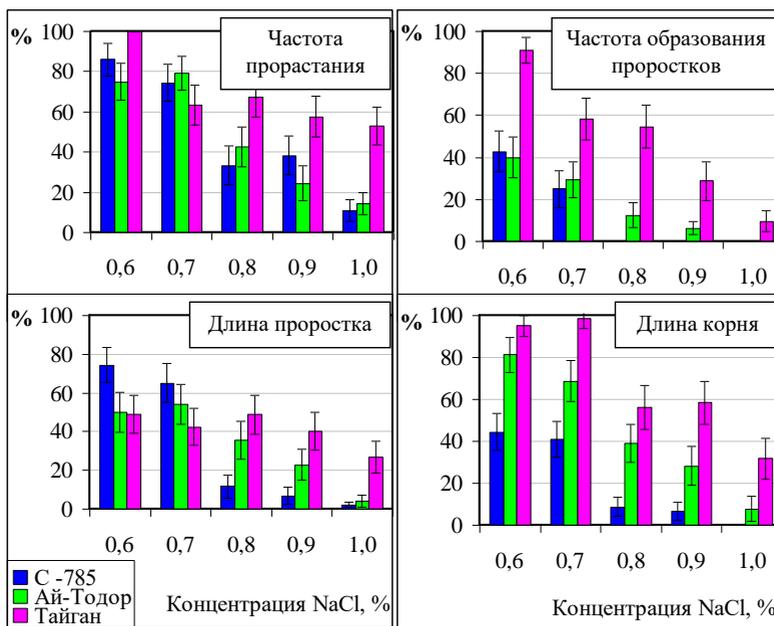
Одной из эффективных клеточных технологий, позволяющей проводить направленный отбор генотипов с заданными признаками, является клеточная селекция [94, 191, 420, 519]. Для шалфея, судя по имеющимся литературным сведениям, исследования в этом направлении ранее не проводились. Разработка приемов отбора *in vitro* с целью создания новых форм с повышенной устойчивостью к абиотическим стрессам позволит расширить спектр исходного селекционного материала. В связи с этим проведено исследование влияния осмотического стресса на

развитие различных биотехнологических объектов – каллусных культур (полученных из гипокотилия или почек проростков *in vitro*) и изолированных зиготических зародышей. Для моделирования осмотического стресса в питательную среду добавляли NaCl или маннит в различных концентрациях и культивировали каллусы или зародыши в течение 1-1,5 месяцев.

При использовании в качестве объектов селекции каллусных культур (полученных из гипокотилия проростков) у сорта С-785 сублетальная концентрация NaCl составила 0,9%. На такой питательной среде прирост каллуса достигал 20,4% от контроля. У сорта Тайган сублетальная концентрация была выше (1,0% NaCl). Культивирование на средах с маннитом каллусов, полученных из гипокотилей проростков сортов С-785 и Тайган, позволило установить сублетальную концентрацию этого осмотика (8-10%). Анализ действия осмотика на пролиферацию каллусов двух сортов, различающихся по засухоустойчивости, показал их различия по степени устойчивости. Так, у более засухоустойчивого сорта Тайган (коэффициент засухоустойчивости 59,8%) прирост массы каллуса к контролю при всех концентрациях маннита был в 1,5-3,0 раза выше, чем у сорта С-785 (коэффициент засухоустойчивости 37,3%). Кроме того, у ‘Тайгана’ сублетальная концентрация маннита была выше, чем у ‘С-785’ – соответственно 10 и 8% маннита (при этих концентрациях наблюдали минимальный прирост каллуса – 8-12% к контролю). Отобранные на фоне осмотика устойчивые каллусные линии показали низкую регенерационную способность, поэтому на данном этапе представляется нецелесообразным использование каллусов для клеточной селекции шалфея. Однако в этом исследовании были выявлены различия по устойчивости к осмотическому стрессу у каллусов разных сортов, которые согласуются с их различной засухоустойчивостью в полевых условиях. По-видимому, это свидетельствует о перспективности использования каллусных культур шалфея для косвенной оценки на засухоустойчивость *in vitro*. Данные об использовании каллусов для тестирования селекционного материала на устойчивость к абиотическим стрессам были, в частности, получены для пшеницы [37].

В дальнейших исследованиях в качестве объекта селекции *in vitro* использовали зиготические зародыши, изолированные из зрелых семян, которые культивировали на средах с NaCl или маннитом. Изучаемые сорта различались по степени полевой засухоустойчивости. В среднем за

2007-2009 гг. наименьший коэффициент засухоустойчивости имел сорт С-785 (27,1%); у сортов Ай-Тодор и Тайган этот показатель был соответственно – 42,0 и 59,9%. При культивировании зародышей на питательных средах с NaCl наблюдали ингибирование развития проростков и снижение всех изученных морфометрических показателей по сравнению с контролем (среда без NaCl). Длина побега и корня, количество пар листьев значительно уменьшались с увеличением концентрации соли (рис. 4.11).

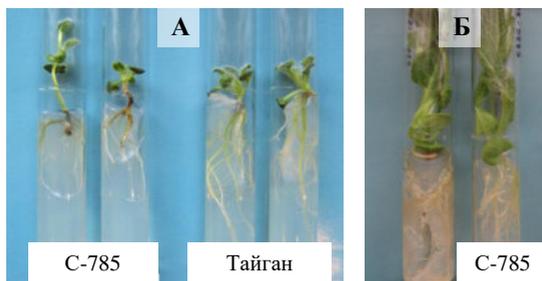


**Рис. 4.11 Влияние концентрации NaCl и сорта на частоту прорастания зародышей и образования проростков, длину проростка и главного корня в эмбриокультуре шалфея, % к контролю**

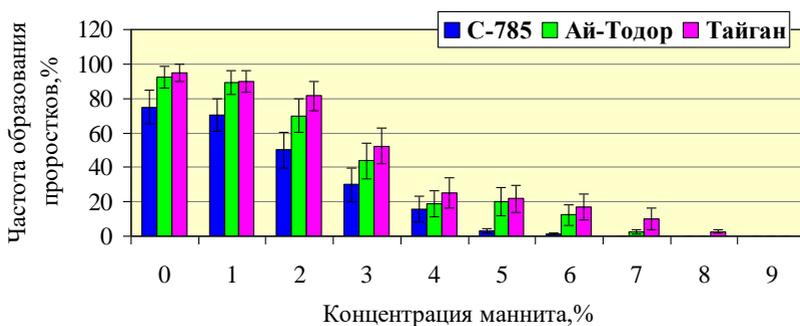
Степень угнетения развития проростков *in vitro* зависела от сорта и была меньше у засухоустойчивого сорта Тайган. Различия изученных генотипов по реакции на засоление среды наиболее четко проявились по основному показателю – частоте образования проростков, а также по степени развития корня. На средах с селективным фактором длина корня у засухоустойчивых сортов была в 4-5 раз больше, чем у сорта С-785.

Сублетальные концентрации соли, при которых можно было получить нормально развитые проростки, зависели от устойчивости генотипа – у более устойчивого сорта Тайган сублетальная концентрация NaCl была выше (1,0%), чем у менее устойчивых сортов Ай-Тодор (0,9%) и С-785 (0,7%) (см. рис. 4.11).

При выращивании зародышей трех различающихся по устойчивости сортов на средах с маннитом (1-10%) также выявлено значительное снижение всех морфометрических параметров (рис. 4.12). На рис. 4.13 представлено влияние этого осмотика на основной параметр, по которому определяли сублетальную концентрацию, – частоту образования проростков. Судя по этим данным, а также по другим показателям развития проростков у изученных сортов эти концентрации различались.



**Рис. 4.12** Развитие зародышей шалфея двух сортов на среде с добавлением 4% маннита (А) и сорта С-785 в контроле (Б)



**Рис. 4.13** Влияние различных концентраций маннита и сорта на частоту образования проростков в культуре зародышей шалфея

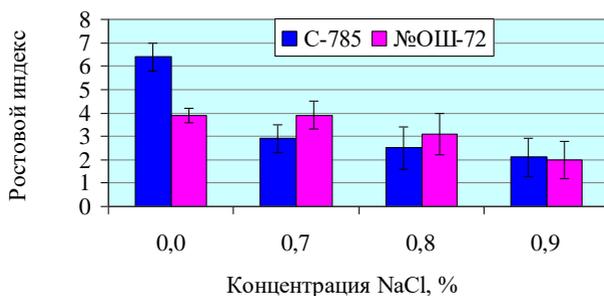
У сорта с меньшей засухоустойчивостью С-785 сублетальная доза (при которой можно было получить нормально развитые проростки) составила 4-5%, у более устойчивого 'Ай-Тодора' – 6-7% и у 'Тайгана' – 7-8%. В вариантах с высокими концентрациями маннита (5-8%) различия генотипов проявились особенно четко – чем выше коэффициент засухоустойчивости сорта, тем больше частота прорастания зародышей и получения проростков. Коэффициенты корреляции между коэффициентами засухоустойчивости и изученными параметрами в этих вариантах составили от 0,71 до 0,98.

Выявленная связь между засухоустойчивостью сортов шалфея в полевых условиях и устойчивостью эмбриокультур к NaCl и манниту *in vitro* позволяет отбирать формы с повышенной устойчивостью к осмотическому стрессу в такой селективной системе. В условиях эмбриокультуры при сублетальных дозах отбирали и адаптировали к условиям *in vivo* растения шалфея, у которых затем в полевых условиях получали семена, используемые для дальнейших исследований.

С целью косвенной оценки устойчивости проведено сравнение исходного сорта С-785 и образца №ОШ-72 (отобранного в эмбриокультуре на среде с 0,7% NaCl) по устойчивости к осмотическому стрессу на уровне полученных из них каллусов. Каллусы из гипокотилия проростков культивировали на средах с 0,7-0,9% NaCl (рис 4.14). При введении в среду 0,7% NaCl у № ОШ-72 ростовой индекс каллуса не изменился по сравнению с контролем (среда без NaCl), тогда как у сорта этот показатель снизился в 2,2 раза. При более высокой концентрации соли у сорта ростовой индекс снизился в 3,1 раза, а у № ОШ-72 – всего в 1,9 раз. При культивировании каллусов на средах с 2-10% маннита также показано, что у №ОШ-72 был больший прирост РИ к контролю, особенно при концентрациях 6-10%. Полученные данные свидетельствуют о более высокой устойчивости к осмотическому стрессу *in vitro* у выделенного в эмбриокультуре образца на уровне каллусов не только на среде с NaCl (на фоне которого он был отобран), но и на питательных средах с маннитом.

С целью проведения двухэтапного отбора, а также косвенной оценки устойчивости, несколько отобранных в эмбриокультуре на фоне осмотического стресса образцов (№№ 785-24; 524; АТ-09; 226-02; 226-08) выращивали в полевых условиях до получения семян и затем повторно подвергали осмотическому стрессу при культивировании зародышей на питательной среде с маннитом. Анализ развития проростков у отобранных в эмбриокультуре образцов и исходных сортов С-785, Ай-

Тодор и Тайган показал, что у отобранных образцов почти при всех концентрациях осмотика частота образования проростков была гораздо выше, чем у исходных сортов (табл. 4.5).



**Рис. 4.14 Влияние NaCl на РИ каллуса у шалфея исходного сорта С-785 и №ОШ-72, отобранного в эмбриокультуре на среде с 0,7% NaCl**

Так, у сорта С-785 при добавлении в среду 5 и 6% маннита развивалось соответственно 4,4 и 1,7% проростков к контролю, а при 7 и 8% проростков не было. Тогда как у образца №785-24 (отобранного на среде с 4% маннита) при 5-8% маннита в среде сформировалось 1,8-15,4% проростков к контролю. Представленные данные свидетельствуют о большей устойчивости к осмотическому стрессу у отобранных образцов, проявляющейся на уровне изолированных зародышей. Наряду с оценкой в культуре зародышей, был проведен второй этап отбора проростков, устойчивых к более высоким концентрациям маннита (6-8%). Полученные из отобранных проростков растения после адаптации выращивали в поле для дальнейшей оценки и использования в селекции.

Семенное потомство нескольких образцов, полученных после первого этапа отбора, помимо оценки в системе *in vitro*, изучали в полевых условиях на экспериментальном участке НИИСХ Крыма (пос. Крымская Роза Белогорского района) по основным хозяйственно ценным признакам, а также по степени засухоустойчивости (табл. 4.6).

Как видно из представленных данных, коэффициенты засухоустойчивости семенного потомства у всех изученных образцов, отобранных в эмбриокультуре при осмотическом стрессе, были на 17-19% выше, чем у исходных сортов. В отдельные годы превышение этого параметра у № 524 и № 226-08 по сравнению с исходными сортами

достигало 52-110%. По массе соцветий достоверное превышение исходного сорта было отмечено у образца № АТ-09. По МДЭМ выделились образцы №524 и №226-08, у которых этот показатель был на 30-46% выше, чем у сортов. По основному признаку – сбору эфирного масла образцы №524 и №226-08 превысили исходные сорта С-785 и Тайган на 34-40%.

**Таблица 4.5 Влияние маннита на частоту образования проростков в культуре зародышей шалфея у исходных сортов и образцов, отобранных в эмбриокультуре (% к контролю на среде без маннита)**

Сорт, образец	Концентрация маннита, %				
	4	5	6	7	8
С-785	22,3±2,9	4,4±0,5	1,7±2,2	0	0
№785-24	27,0±2,9	15,4±2,2*	10,1±0,9*	3,4±0,2*	1,8±0,2*
№524	38,1±3,2*	21,5±1,8*	12,2±1,3*	3,8±0,5*	0,7±0,1*
Ай-Тодор	10,8±1,2	21,6±2,4	13,5±2,0	2,7±0,3	0
АТ- 09	34,7±4,0*	33,4±2,9*	15,1±2,2	7,1±1,0	1,9±2,2*
Тайган	26,3±3,0	21,1±2,4	17,6±2,1	10,5±1,2	2,6±0,4
226-02	36,4±3,4	32,4±3,3*	27,7±2,4*	13,7±1,5	1,6±0,2
226-08	39,4±3,3*	33,4±3,4*	28,3±2,5*	17,5±1,7*	5,5±0,6*

\* Различия достоверны при сравнении с исходным сортом при  $p \leq 0,05$

Примечания: образцы №785-24 и №524 отобраны в эмбриокультуре у сорта С785 на среде с 4% маннита; АТ-09 – у сорта Ай-Тодор на среде с 0,9% NaCl; №№ 226-02 и 226-08 – у сорта Тайган соответственно на средах с 0,7% и 0,8% NaCl

**Таблица 4.6 Основные хозяйственно ценные признаки образцов шалфея, отобранных на фоне осмотического стресса в эмбриокультуре, и исходных сортов (2006-2010 гг.)**

Сорт, образец**	Масса соцветий, г/растения	МДЭМ, %	Сбор эфирного масла, г/растения	Коэффициент засухоустойчивости, %
Сорт С-785	448,0	0,271	1,25	27,07
№785-24	403,2	0,347	1,36	31,68
№ 524	490,1	0,420*	2,04*	37,81*
Сорт Ай-Тодор	354,5	0,294	1,04	41,98
№ АТ-09	556,7*	0,202	1,16	49,71
Сорт Тайган	306,5	0,320	0,96	59,87
№226-02	344,5	0,163	0,56	68,60
№226-08	377,9	0,420*	1,56*	71,58*
НСР <sub>05</sub>	120,3	0,080	0,52	

\*Превышение исходного сорта достоверно при  $p \leq 0,05$

\*\*Происхождение отобранных образцов – см. табл. 4.5

Таким образом, при изучении действия осмотического стресса на изолированные культуры шалфея мускатного определена селективная система, включающая использование эмбриокультуры, а в качестве селективных факторов маннита и NaCl. Впервые разработана методика селекции шалфея *in vitro* с применением двухэтапного отбора [197] и получен патент [161]. Анализ образцов, полученных в эмбриокультуре на селективном фоне, показал повышенную устойчивость некоторых регенерантов к осмотическому стрессу по сравнению с исходными сортами как на уровне изолированных каллусов и зародышей, так и на уровне целых растений, что свидетельствует об эффективности разработанной методики. Полевая оценка подтвердила перспективность проведения отбора *in vitro* и позволила выделить ценные образцы, отличающиеся повышенными коэффициентами засухоустойчивости и показателями основных хозяйственных признаков, которые переданы в питомник предварительного сортоиспытания.

#### **4.5 Оптимизация условий клонального микроразмножения в культуре *in vitro***

Одной из задач исследования была разработка методики микроразмножения шалфея. Это необходимо как для клонирования полученных *in vitro* регенерантов, так и для быстрого размножения ценных генотипов, созданных традиционными методами. Для размножения чаще всего используют культуру изолированных меристем, хотя во многих работах для индукции пазушного или адвентивного побегообразования применялись сегменты стебля с одним узлом. При этом можно выделять экспланты из взрослых растений, в том числе и регенерантов, а также из полученных *in vitro* проростков. При разработке метода микроразмножения из-за доступности материала в любое время года был выбран второй вариант.

Для введения в асептическую культуру меристемы с 2 примордиями (0,6-0,8мм) выделяли из пазушных почек 4-5 недельных проростков, полученных из семян *in vitro*. В предварительных опытах установлено, что для лучшего развития меристем шалфея необходимо введение в среду МС цитокинина и ГК<sub>3</sub>. В таблице 4.7 приведены данные о влиянии различных концентраций БАП, Кин и ГК<sub>3</sub> на морфогенез меристем у сорта С-785. На первом этапе введения меристем у шалфея происходило формирование основного побега длиной до 2-3 см. Наряду с этим наблюдали множественное

побегообразование с частотой 12,6-54,8%. Количество дополнительных побегов не превышало 1,8 шт. на эксплант. На испытанных средах иногда формировался морфогенный каллус. Сравнение действия двух цитокининов показало, что БАП способствовал лучшей индукции множественного побегообразования, однако длина побегов была больше при использовании Кин. Оптимальное сочетание всех показателей развития меристем на этом этапе обеспечила среда МС с 2,0 мг/л Кин и 0,1 мг/л ГК<sub>3</sub>.

**Таблица 4.7 Влияние гормонального состава питательной среды на развитие меристем шалфея сорта С-785**

Гормональные добавки в среде МС, мг/л	Длина основного побега, см	Частота множественного побегообразования, %	Количество дополнительных побегов на эксплант, шт.	Частота каллусогенеза, %
БАП(1,0)+ГК <sub>3</sub> (0,5)	0,8±0,1	41,7±5,0	1,8±0,3	8,3±1,0
БАП(2,0)+ГК <sub>3</sub> (0,5)	0,9±0,1	22,8±2,8	1,7±0,2	13,7±1,1
Кин(1,0)+ГК <sub>3</sub> (0,5)	1,2±0,2	12,6±2,2	0,5±0,1	18,4±2,2
Кин(2,0)+ГК <sub>3</sub> (0,5)	1,9±0,2	45,5±5,1	0,8±0,1	10,0±1,2
Кин(0,5)+ГК <sub>3</sub> (0,1)	1,4±0,2	13,6±2,0	1,5±0,2	14,2±1,5
Кин(2,0)+ГК <sub>3</sub> (0,1)	2,2±0,3	54,8±4,7	1,3±0,2	12,6±2,0

Следующий этап размножения (собственно микроразмножение) осуществляется у многих видов путем микрочеренкования основного побега или индукции адвентивных. В качестве эксплантов у шалфея на этом этапе использовали микрочеренки, выделенные из побегов, развившихся из меристем. При эксплантации на питательную среду сегментов стебля с узлом чаще всего наблюдали развитие одного побега из пазушной почки длиной до 4-8 см с 3-6 узлами (рис. 4.15). Помимо основного хорошо развитого побега происходила индукция адвентивных побегов у основания микрочеренка. Такие дополнительные побеги были небольшими (до 2-3 см с 1-3 узлами) и их среднее количество на эксплант не превышало 3,7 штук. Поэтому для микроразмножения шалфея можно использовать черенкование не только основного, но и дополнительных побегов.

**Рис. 4.15 Развитие микропобегов на 2-м этапе клонального микроразмножения *in vitro* шалфея сорта С-785**



Основные показатели развития эксплантов на втором этапе зависели от гормонального состава питательной среды (табл. 4.8). Также как и на этапе введения меристем, БАП способствовал активному адвентивному побегообразованию (до 100%), однако побеги были небольшими. При введении Кин, наоборот, развивались более вытянутые побеги (в среднем до 6,9 см), которые имели большее число узлов, и их можно было разделить на большее количество микрочеренков. Максимальный коэффициент размножения (9,1) отмечен на среде МС, дополненной 2,0 мг/л Кин и 0,1 мг/л ГК<sub>3</sub>, которая была лучшей и на этапе введения меристем. У других сортов коэффициенты размножения на этой среде были ниже: у сорта С-1122 – 5,4, а у сорта Ай-Годор – 6,8 (за одно субкультивирование).

**Таблица 4.8 Влияние гормонального состава питательной среды на развитие эксплантов на 2-м этапе размножения шалфея сорта С-785**

Гормональные добавки в среде МС, мг/л	Длина основного побега, см	ЧМП, %	Количество		К.Р.
			побегов на эксплант, шт.	узлов на побег, шт.	
БАП(1,0)+ГК <sub>3</sub> (0,5)	1,9±0,5	100,0	4,3±0,4	1,7±0,2	6,9±0,5
БАП(2,0)+ГК <sub>3</sub> (0,5)	2,2±0,4	92,5±8,7	4,5±0,4	1,7±0,1	7,4±0,6
Кин(1,0)+ГК <sub>3</sub> (0,5)	4,2±0,6	73,3±8,0	2,9±0,2	1,9±0,2	5,5±0,5
Кин(2,0)+ГК <sub>3</sub> (0,5)	2,8±0,4	86,4±7,2	4,7±0,5	1,8±0,2	8,5±0,8
Кин(1,0)+ГК <sub>3</sub> (2,0)	4,4±0,5	92,7±8,3	1,9±0,2	2,1±0,2	4,0±0,3
Кин(0,5)+ГК <sub>3</sub> (0,1)	4,0±0,5	25,1±3,1	4,0±0,5	2,1±0,2	8,0±0,7
Кин(2,0)+ГК <sub>3</sub> (0,1)	6,9±0,9	66,75,4	3,5±0,3	2,6±0,2	9,1±0,8

При развитии микрочеренков у их основания почти на всех испытанных питательных средах иногда наблюдали образование каллуса, что при разработке методов клонирования нежелательно из-за возможности появления соматональных изменений. Такой каллус у шалфея часто был морфогенным, поэтому при размножении его удаляли, а для дальнейшего черенкования использовали побеги, образующиеся при прямом морфогенезе. Формирование каллуса отмечали при микроразмножении и у других видов шалфея – *S. officinalis*, *S. africana-lutea*, *S. nemorosa* [357, 439, 550].

Показано, что на эффективность микроразмножения оказывало влияние расположение экспланта на побеге, полученном *in vitro*. При культивировании микрочеренков, выделенных из нижней (1-2-й узел), средней (3-4-й узел) и верхней (5-6-й узел) части побега значительно варьировали все изученные показатели (табл. 4.9). Полученные данные свидетельствуют о большей эффективности использования эксплантов из средней или нижней части побега – в этих вариантах не только повышалась частота множественного побегообразования, число побегов и коэффициент размножения, но и значительно снижалась частота каллусогенеза. Такая разнообразная реакция эксплантов из различных ярусов побега связана, по-видимому, с различным уровнем эндогенных фитогормонов, определяющих направленность морфогенетических процессов при введении эксплантов в культуру. При изучении микроразмножения двух эндемичных испанских видов шалфея максимальную пролиферацию побегов отмечали при использовании узловых эксплантов стебля, а не его верхушек [307].

**Таблица 4.9 Влияние расположения экспланта на побеге на развитие микрочеренков шалфея сорта С-785**

Расположение экспланта на побеге	Количество побегов на эксплант, шт.	Количество узлов на побег, шт.	ЧМП, %	Частота каллусогенеза, %	К.Р.
1-2-й узел	4,1±0,4*	1,9±0,2	85,4±7,6*	7,9±1,0*	7,8±0,6*
3-4-й узел	5,4±0,5*	1,9±0,1	96,7±8,5*	6,8±0,7*	10,3±1,0*
5-6-й узел	1,2±0,1	1,7±0,1	4,8±0,5	86,7±8,2	2,0±0,2

\*Различия достоверны при сравнении параметров с 5-6 узлом при  $p \leq 0,05$

Установлено, что у шалфея на развитие микрочеренков на втором этапе размножения значительное влияние оказывало количество

субкультивирований (рис. 4.16). Коэффициент размножения в течение первых трех субкультивирований был относительно высоким (8,4-9,7), затем постепенно снижался и после 7-го пассажа достоверно не менялся. Поэтому для эффективного размножения шалфея целесообразно проводить микрочеренкование *in vitro* не более 5 субкультивирований. У ряда видов растений, наоборот, было показано повышение коэффициента размножения к 3-5-му пассажам [69, 75, 76, 143].



**Рис. 4.16** Влияние количества субкультивирований на коэффициент размножения у шалфея сорта С-785

Поскольку образование побегов с корнями на втором этапе размножения было достаточно редким событием, у шалфея для получения полноценных растений необходимо переносить побеги на среду для укоренения. Как показали исследования наибольшая частота укоренения (до 75-82%) у трех изученных сортов отмечалась при использовании среды МС с половинной концентрацией макро- и микроэлементов и добавлением 2,0 мг/л ИМК и 1% сахарозы. Полученные растения адаптировали к условиям *in vivo* в вазонах со смесью торфа и земли (1:1) с использованием традиционных приемов адаптации пробирочных растений. Частота адаптации размноженных растений была достаточно высокой (до 76-92%) и зависела от генотипа. При размножении регенерантов, полученных из поздних 6-10-го пассажей, показано снижение их приживаемости до 10-20%.

Исследования по микроразмножению шалфея проведены для многих видов – *S. officinalis* [256, 357, 360], *S. sclarea* [351], *S. nemorosa* [550], *S. africana-lutea*, [439], *S. brachyodon* [451], *S. chamelaeagnea* [377], *S. pratensis*, *S. nemorosa* [526], *S. blancoana*, *S. valentina* [307], *S. guaranitica* [328]. В этих работах для клонального размножения

использовали пазушные или апикальные почки [360, 568], сегменты стебля с узлом [357, 360], экспланты из проростков *in vitro* [439], каллусные ткани [377]. Некоторые исследователи отмечали влияние на эффективность микроразмножения генотипа и освещенности [307, 444]. Что касается состава питательных сред, то у *S. officinalis* при использовании верхушек побегов наиболее эффективной была среда МС с добавлением БАП и ИУК, на которой формировалось в среднем 3 побега на эксплант [360]. В ряде работ показано преимущество применения для размножения видов *Salvia* БАП [444, 526], хотя в других – Кин и ГК<sub>3</sub> [307]. У изученных сортов шалфея мускатного для размножения *in vitro* мы выделяли меристемы или микрочеренки, при этом наиболее подходящей для размножения оказалась среда МС с Кин и ГК<sub>3</sub>, на которой коэффициент размножения достигал 9-10, в зависимости от сорта и пассажа. Среди испытанных питательных сред для укоренения побегов в наших опытах наибольшую эффективность проявила среда МС с добавлением ИМК, тогда как у *S. chamelaeagnea* – с введением НУК [377], у *S. africana-lutea* – с добавлением ИМК и активированного угля [439], а у *S. valentina* и *S. blancoana* – безгормональная среда [307].

На основании экспериментальных данных разработана система создания и размножения новых форм шалфея мускатного, включающая комплекс методов клеточной инженерии (рис. 4.17). Для создания новых форм предполагается использовать соматональные варианты из каллусных культур, а также двухэтапную селекцию *in vitro* в эмбриокультуре, позволяющую создавать генотипы с повышенной устойчивостью к осмотическому стрессу. В качестве заключительного этапа этих технологий целесообразно включать клональное микроразмножение, которое позволяет быстро размножить регенеранты, а также может использоваться и как самостоятельный метод клонирования ценных генотипов шалфея. Об эффективности разработанных биотехнологических приемов может свидетельствовать получение ценного исходного селекционного материала и создание нового сорта шалфея мускатного Селинж.



## ГЛАВА 5

### РОЗА ЭФИРОМАСЛИЧНАЯ (*ROSA* SPP.)

Роза (*Rosa*) – отдельный род подсемейства розовые (*Rosaidea*) семейства Розоцветные (*Rosaceae*), который включает более 400 видов, большинство из которых декоративные, и лишь немногие выращиваются как эфиромасличные (*R. damascena* Mill., *R. gallica* L. и другие) [151, 164]. Роза эфиромасличная является одним из наиболее ценных ароматических и лекарственных растений, культивируемых во многих странах мира уже несколько тысячелетий. Интерес к этому растению связан с широким спектром его использования. Продукты переработки цветков розы применяются в медицине, парфюмерно-косметической промышленности, ликероводочном и кондитерском производстве. Из цветков получают достоящее эфирное масло, в состав которого входят цитронеллол, гераниол, нерол,  $\beta$ -фенилэтиловый спирт [68, 151, 164, 194]. Эфирное масло розы и другие продукты ее переработки (абсолют, конкрет, настои лепестков, листьев, корней, плодов) используются при лечении полости рта и горла, сердечно-сосудистой системы, а также холецистита, гастрита, язвы, желчекаменной болезни, гиповитаминозов, невродов и других заболеваний [165, 390].

Родиной эфиромасличной розы, по мнению многих ученых, является Сирия и Иран, откуда она распространилась в Турцию, Индию, Египет, Болгарию, Францию, Испанию, Россию и другие страны [123]. Более 300 лет назад ее начали возделывать в Болгарии как промышленную культуру, используя для посадки высокомасличные формы дамасской розы, позже названные Казанлыкской. В России роза выращивается в южных регионах, главным образом в Крыму. При этом используются высокопродуктивные сорта селекции ФГБУН «НИИСХ Крыма» или ФГБУН «ОТКЗ НБС-ННЦ РАН» – Радуга, Лань, Лада, Мичуринка, Фестивальная, Аура, Золушка [39, 68, 150, 164].

Роза эфиромасличная представляет собой многолетний кустарник с 6-12 основными побегами. Листья длинночерешковые, сложные, располагаются на побегах спирально. Цветки собраны в метелковидное соцветие (сложный верхцветник), в котором находится до 30 и более бутонов. Цветоложе вместе с тычинками и пестиками разрастается, образуя ложный плод (гипантий), внутри которого развиваются односемянные плоды. Эфирное масло содержится преимущественно в лепестках, хотя в незначительных количествах оно выявлено и в других частях цветка [150].

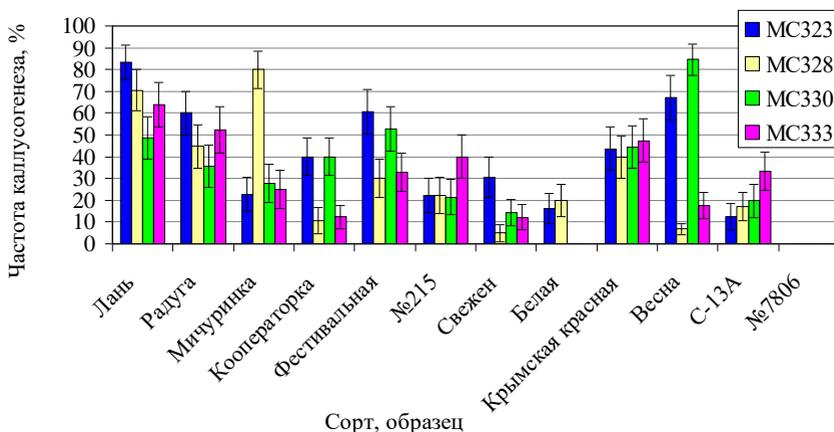
Исследования по культуре тканей видов розы эфиромасличной в основном касаются вопросов микроразмножения *in vitro* у [68, 69, 139, 257, 258, 281, 388, 405, 423, 450, 454, 485]. В качестве эксплантов авторы чаще всего использовали меристемы, пазушные почки или сегменты стебля с узлом, при этом изучали влияние состава питательной среды на их развитие на этапах клонального размножения [405, 450, 531]. В частности, болгарские и иранские ученые [388, 485] представили данные, касающиеся подбора питательных сред для различных этапов микроразмножения дамасской розы при использовании в качестве эксплантов пазушных почек растений. Имеются также работы, в которых освещены отдельные вопросы депонирования *in vitro* [140, 155, 456], получения безвирусного посадочного материала [65, 68, 73, 140, 330], индукции морфогенеза в каллусной культуре или получения вторичных метаболитов у розы эфиромасличной [290, 386, 405].

### **5.1 Получение и характеристика каллусных культур *in vitro***

Роза эфиромасличная представляет довольно удачный объект для исследования накопления эфирного масла *in vitro*, так как эфирное масло у нее накапливается в тканях лепестков цветка, в отличие от многих других видов, у которых для этого необходимы специализированные экзогенные или эндогенные секреторные структуры [22]. Для некоторых видов или сортов розы показана возможность биосинтеза в культуре клеток и тканей отдельных вторичных метаболитов – полифенолов, терпеноидов, пигмента [65, 100, 264, 265, 386]. Однако для изучения возможности использования изолированных культур эфиромасличной розы в качестве продуцентов продуктов вторичного метаболизма на первом этапе необходимо оптимизировать условия получения и длительного культивирования клеточных культур, выявить природу синтезируемых веществ и установить динамику их накопления.

Известно, что определенные классы вторичных метаболитов, как правило, накапливаются в клеточных культурах, происходящих из тех органов, в которых они выявляются на интактном растении [26, 112, 153, 176]. В качестве эксплантов для получения каллусных тканей использовали лепестки цветков, так как у розы эфирное масло содержится преимущественно в этих органах. В исследованиях использовали различающиеся по содержанию эфирного масла сорта и образцы – Радуга, Лань, Крымская Красная, Мичуринка, Весна, Белая, Кооператорка, Свежен, Фестивальная, №№ 215, С-13А, 7806 [150, 164].

При введении эксплантов в культуру *in vitro* почти у всех изученных сортов и образцов наблюдали индукцию процесса каллусообразования. Показано, что на частоту каллусогенеза значительное влияние оказывал генотип и состав питательной среды. В этом эксперименте проанализировано 16 модификаций питательной среды МС с добавлением НУК, ИУК, 2,4-Д, БАП, Кин в разных концентрациях. На рис. 5.1 представлены данные, полученные при культивировании сегментов лепестков на 4-х вариантах среды МС. У сортов Белая, Свежен и образцов С-13А и М 215 максимальная частота образования каллуса на оптимальных средах составила всего 25,5-40,0%. У остальных генотипов интенсивность каллусообразования достигала 70-85%. Однако у образца № 7806 ни на одной из испытанных сред каллус не формировался. Полученные данные свидетельствуют о значительной вариабельности генотипов розы по способности к каллусогенезу в зависимости от гормонального состава среды. Так, у сортов Лань, Радуга, Фестивальная максимальная частота образования каллуса отмечена на среде МС323, тогда как у ‘Мичуринки’ – на МС328, а у образцов М215 и С-13А – на МС333 (см. рис. 5.1).



**Рис. 5.1 Влияние генотипа и гормонального состава питательной среды на индукцию каллусогенеза у розы эфиромасличной**

Регуляторы роста в среде МС (мг/л) – МС323 - 2,4-Д (4,0)+Кин (0,5); МС328 - 2,4-Д (2,0)+ Кин (0,5); МС330 - 2,4-Д (2,0)+ НУК(2,0)+ Кин (0,1); МС333- НУК (2,0)+ БАП (0,5)

Для всех сортов и образцов подобраны модификации питательной среды, обеспечивающие высокую частоту каллусообразования. Для

большинства сортов (Лань, Крымская Красная, Радуга, Фестивальная, Кооператорка, Мичуринка, Свежен) это среды МС, содержащие 2,0-4,0 мг/л 2,4-Д и 0,1-0,5 мг/л Кин. Хотя у образцов М 215 и С-13А максимальную индукцию каллуса обеспечило введение в среду 2,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП, а у сорта Весна – 2,0 мг/л 2,4-Д и НУК и 0,1 мг/л Кин. Для некоторых видов розы (*R. damascene*, *R. canina*, *R. dumalis*, *R. hybrida*) сообщалось, что для индукции каллусообразования из эксплантов лепестка или стебля необходимо введение в питательную среду НУК и БАП [332, 335, 427].

Анализ культивируемых в течение нескольких лет каллусных тканей розы выявил их высокую морфологическую гетерогенность, проявляющуюся в зависимости от сорта, штамма и состава питательной среды, а иногда даже в пределах одного штамма на среде одного и того же состава (табл. 1.1).

**Таблица 5.1 Характеристика каллусных культур некоторых сортов розы эфиромасличной**

Признак	Варьирование признака	Количество штаммов от общего числа изученных, %		
		Крымская Красная	Мичуринка	Лань
Окраска	светло-бежевая, кремовая	11,5	28,6	21,1
	зеленая	3,8	0	31,6
	бежевая с красными зонами	8,5	57,1	10,5
	бурая и коричневая	46,2	14,3	36,8
Консистенция	твердая, компактная	24,0	28,6	84,2
	неоднородная (каллус, распадается на участки)	0	14,3	0
	рыхлая водянистая	76,0	57,1	15,8
Прирост биомассы	интенсивный (РИ 13-18)	76,9	67,1	10,5
	средний (РИ 7-12)	23,1	32,9	36,8
	слабый (РИ до 6)	0	0	52,7

Представленная характеристика каллусных культур трех сортов розы свидетельствует о высокой вариабельности каллусов различных штаммов в пределах сорта, а также о различиях между сортами по изученным признакам. Интенсивность прироста каллуса в значительной степени зависела от генотипа. Максимальный ростовой индекс (до 17-

19) отмечали у сортов Мичуринка, Крымская Красная и образцов М215, С-13А. Например, в 6-ом пассаже на среде МС324 у ‘Мичуринки’ РИ составлял  $18,2 \pm 0,9$ , а у ‘Крымской Красной’ –  $16,4 \pm 0,8$ . У сортов Лань и Радуга РИ на оптимальных средах РИ достигал 14-15, тогда как у ‘Весны’, ‘Фестивальной’ и ‘Кооператорки’ этот параметр не превышал 7-10. У сорта Белая на испытанных средах РИ был минимальным – до  $3,4 \pm 0,5$ . Такие существенные различия по способности к каллусогенезу у изученных сортов розы, по-видимому, объясняются их разным происхождением при межвидовой гибридизации с использованием сложных комбинаций скрещивания [150, 164]. Значительная роль генотипа в процессах пролиферации каллусной ткани неоднократно отмечалась во многих работах и у других растений, в том числе и у разных видов роз [112, 332, 425].

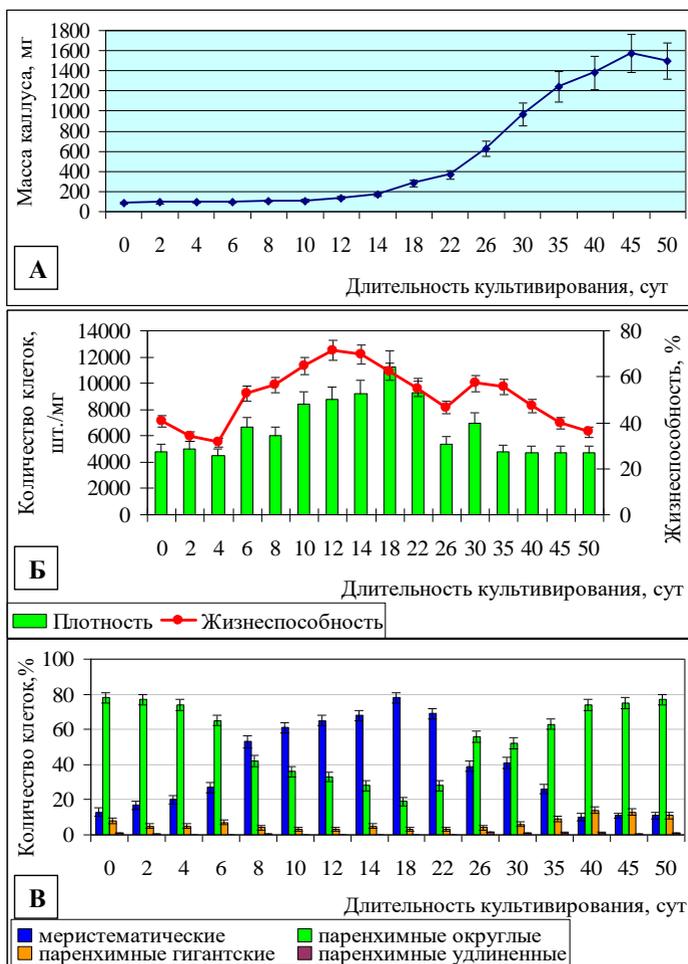
Важным этапом клеточных технологий, особенно для получения вторичных метаболитов *in vitro*, является подбор состава питательной среды, обеспечивающей интенсивный прирост каллуса при длительном выращивании в пересадочной культуре. Проведен анализ влияния гормонального состава среды МС на прирост массы каллуса 10-ти сортов розы в течение 10-ти пассажей. Установлено, что у ряда сортов (Мичуринка, Весна, Свежен, Белая) и образцов (М215 и С-13А) среды, оптимальные для индукции каллуса, обеспечивали его максимальный прирост и при длительном культивировании. Однако у других сортов среды, на которых отмечали наибольшую частоту формирования каллуса, при последующем субкультивировании не способствовали его хорошей пролиферации. Так, у ‘Крымской Красной’, ‘Фестивальной’ и ‘Радуги’ на средах для образования каллуса (МС319 и МС323) по мере его культивирования происходило снижение ростового индекса. Для таких сортов подобраны составы сред для длительного пассирования, включающие замену Кин на БАП (‘Лань’, ‘Радуга’, ‘Крымская Красная’) или снижение с 4,0 до 2,0 мг/л концентрации 2,4-Д (‘Фестивальная’, ‘Кооператорка’). При культивировании каллусов различных сортов розы на разработанных модификациях сред обеспечивался стабильно высокий прирост биомассы (РИ 6,1-13,7) при пассировании в течение как минимум 3-5 лет.

В.А. Кунах описал 5 основных типов роста каллусных штаммов при длительном культивировании у некоторых видов растений [112]. У розы эфиромасличной выявлены несколько аналогичных типов, которые

зависели от состава питательной среды и сорта. В одних вариантах наблюдали снижение РИ каллуса в ходе пассирования, вплоть до прекращения роста (например, у 'Фестивальной' на средах МС323, 330), в других – прирост каллуса не менялся в течение 10 пассажей (например, у 'Мичуринки' на средах МС328, 324). У 'Крымской Красной', наоборот, установлено снижение РИ в 5-6-м пассажах, а затем его повышение. Вероятно, такие варианты динамики роста могут определяться не только штаммовыми различиями, но и влиянием генотипа и составом гормонов в среде, что может быть обусловлено изменяющимся уровнем эндогенных фитогормонов в каллусе и, следовательно, меняющейся в ходе культивирования потребностью тканей в разных регуляторах роста.

Для разработки многих клеточных технологий, особенно получения биологически активных веществ *in vitro*, важен анализ цитофизиологических параметров культур в цикле выращивания. Установлено, что в культуре ткани розы за цикл выращивания происходило 17-кратное увеличение сырой массы (рис. 5.2). В течение первой недели после пересадки на свежую питательную среду масса каллуса и его плотность практически не изменялись, что соответствует лаг-фазе ростового цикла. При этом число различных типов клеток не изменялось, а их жизнеспособность снижалась до 34,5%. Усиление гибели клеток в это время связано с травматическим действием пересадки и адаптацией ткани.

Переход популяции клеток в экспоненциальную фазу роста отмечен на 6-8-е сутки, когда отмечали достоверное повышение массы каллуса и плотности. В этот период происходила перестройка популяции клеток, связанная с прогрессирующей пролиферацией. Как следствие интенсивных делений увеличилось в 2-4 раза число меристематических клеток, повысилась жизнеспособность популяции (до 71,4%) и плотность каллуса. Максимальную плотность каллуса и количество меристематических клеток отмечали на 18-е сутки цикла. После этого, примерно с 22-х суток, темпы делений клеток в популяции, по-видимому, снижались, и начинался их рост. Об этом свидетельствует уменьшение числа меристематических и увеличение количества паренхимных клеток, снижение в 1,5-2 раза плотности каллуса. В этот период линейной фазы роста увеличение массы каллуса происходило преимущественно за счет растяжения клеток.



**Рис. 5.2** Динамика изменения массы каллуса (А), плотности и жизнеспособности клеточной популяции (Б) и соотношения различных типов клеток (В) в цикле выращивания каллуса розы сорта Мичуринка

В стационарную фазу роста популяция каллусных клеток переходила на 40-45-е сутки культивирования, когда прекращался достоверный прирост массы, стабилизировалась плотность каллуса и количество разных типов клеток. В популяции начинались процессы старения и деградации, что привело к усилению гибели клеток и снижению жизнеспособности до

47,4 %. В конце цикла выращивания в каллусе преобладали паренхимные округлые (75-78%) и гигантские клетки (10-14%). Выявленные особенности динамики роста популяции клеток в цикле выращивания обуславливают приемы культивирования каллуса, в частности, длительность цикла выращивания, который у розы должен быть не менее 45-50 сут.

## **5.2 Исследование накопления некоторых вторичных метаболитов в каллусных культурах**

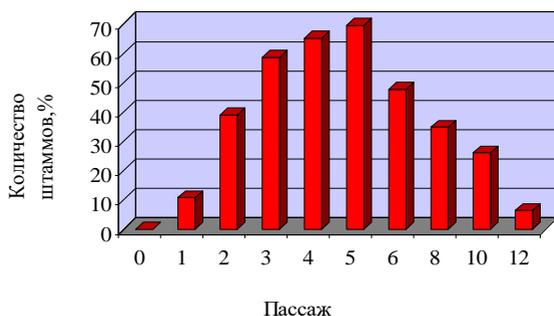
Изучение образования пигментов в культуре изолированных клеток и тканей является довольно интересным с практической точки зрения направлением биотехнологии. Достаточно подробно изучено образование шиконина в клеточных культурах воробейника [112]. Пигменты красного цвета также обнаруживали в каллусах земляники [375]. Имеется сообщение об образовании в суспензионной культуре декоративной розы «Паульс Скарлет» пурпурно-красного пигмента [цит. по 405]. В каллусных культурах, полученных из эксплантов лепестков цветов и листьев *Rosa hybrida*, обнаружены антоциановые пигменты, на накопление которых влияла концентрация сахарозы в питательной среде [513]. В наших исследованиях при морфологическом анализе каллусных культур розы в некоторых вариантах в каллусе наблюдали красные пигментированные участки. Полученные данные свидетельствуют о том, что накопление красного пигмента в каллусе у некоторых сортов розы эфиромасличной зависело от генотипа, длительности культивирования и штаммовых различий. Из 11 изученных генотипов появление пигмента отмечали в каллусных штаммах сортов Крымская Красная, Мичуринка и реже – у сортов Весна, Лань, Свежен и образца M215. У остальных сортов ни на одной из 18-ти испытанных модификаций среды МС пигмент не обнаружен.

Изучение накопления пигмента в течение цикла выращивания у сорта Мичуринка показало, что появление красных участков в каллусе совпадало с линейной фазой роста, а максимальное количество окрашенных трансплантов (до 78%) приходилось на начало стационарной фазы. После этого пигментированные участки у большинства каллусов постепенно теряли яркую окраску и становились бурыми. При цитологическом анализе пигментированных штаммов выявлено, что красный пигмент накапливался в вакуолях у 5-10% крупных паренхимных каллусных клеток.

Влияние длительности культивирования на образование пигмента исследовано на примере 46 штаммов розы сорта Крымская Красная в

течение 12 пассажей (рис. 5.3). Установлено, что в первичном каллусе пигмент не обнаруживался, а у большинства штаммов образование пигмента начиналось со 2-3-го пассажа и к пятому количество окрашенных штаммов достигало максимального значения (69,7%). При субкультивировании количество штаммов с пигментированными участками снижалось.

Отличительной особенностью каллусных культур розы, как отмечалось, являлась их высокая гетерогенность и появление различий не только между разными штаммами, но и в пределах одного штамма по ростовой активности, морфологии и способности к накоплению пигмента. Такая вариабельность по способности к синтезу пигмента в пределах штамма, а также уменьшение числа синтезирующих пигмент штаммов при длительном культивировании, свидетельствуют о перспективности проведения отбора штаммов и клеточных линий с повышенной биосинтетической способностью. С использованием приемов визуальной клеточной селекции у сорта Крымская Красная в течение 5-10 пассажей проведено несколько циклов отборов, что позволило увеличить продолжительность образования пигментированных каллусов до 20-26-го пассажей.



**Рис. 5.3** Влияние пассажа на накопление красного пигмента в различных каллусных штаммах у розы сорта Крымская Красная

Исследование способности каллусных культур розы к образованию эфирного масла проведено на сортах и селекционных образцах, различающихся по масличности, – Крымская Красная, Мичуринка, Лань, Свежен, Весна и М215. При анализе накопления экстрактивного масла в каллусе сорта Мичуринка, находящемся в

экспоненциальной фазе роста цикла выращивания (15-е сут), отмечали лишь следы монотерпенов. На 30-е сутки их содержание увеличилось, а максимальное содержание хроматографируемых компонентов обнаружили при переходе популяции в стационарную фазу роста (45-50 сут). Следовательно, в каллусной ткани розы накопление компонентов эфирного масла начиналось после завершения активных делений клеток и роста ткани, что свидетельствует о разобщенности во времени процессов роста в популяции и биосинтеза этих вторичных метаболитов. Поэтому в дальнейшем для исследований у розы использовали каллусы на стационарной фазе роста. Некоторые аналогичные закономерности синтеза биологически активных веществ выявлены в клеточных культурах ряда видов растений [112, 153, 176].

Биохимический анализ гексановых экстрактов из каллусов 48-ми штаммов шести генотипов розы, проведенный в течение нескольких пассажей, показал, что у большинства изученных штаммов синтезировались лишь отдельные компоненты эфирного масла. При этом содержание экстрактивного масла из сырой биомассы каллуса было почти в 10-100 раз меньше, чем в свежих цветках розы, а в некоторых штаммах выявлены его следовые количества. В табл. 5.2 представлены данные о накоплении компонентов экстрактивного масла у 4-х сортов в зависимости от штамма и питательной среды.

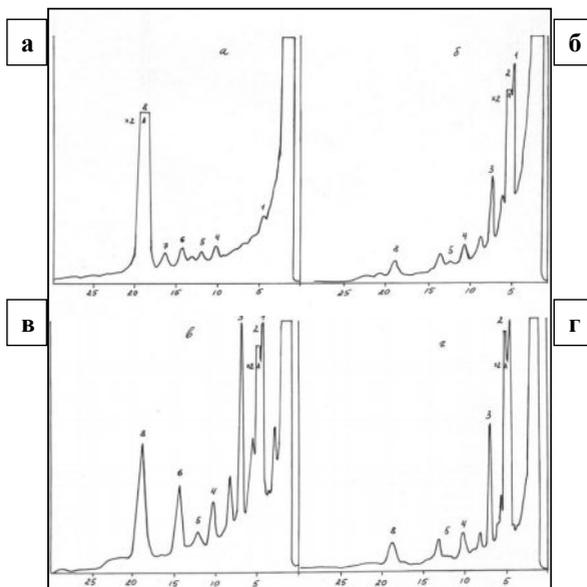
Установлено, что в каллусной ткани 6-го пассажа только у штамма №118-2 содержание хроматографируемых компонентов достигало 0,014 %, а у остальных штаммов было гораздо ниже. В то же время МДЭМ в цветках у этого сорта составляла 0,125% [150]. Показано, что у всех сортов обнаруживались штаммы как с высоким, так и низким содержанием масла. Например, штаммы с повышенным содержанием экстрактивного масла (до 0,014%) выявлены и у высокомасличного сорта Мичуринка, и у низкомасличного сорта Крымская Красная. МДЭМ в цветках этих сортов составляла соответственно 0,16 и 0,07% [150]. При дальнейшем культивировании, в 7-10-м пассажах, содержание масла в каллусах в несколько раз снижалось по сравнению с 5-6-м пассажами. Однако при этом выделили несколько продуктивных штаммов, которые сохраняли способность к синтезу эфирного масла вплоть до 22-го пассажа. Аналогичное снижение содержания эфирного масла с увеличением длительности культивирования установлено для каллусных культур ромашки, петрушки и других видов [112, 182, 348, 541].

**Таблица 5.2 Накопление экстрактивного масла в каллусах 6 пассажа у некоторых сортов и каллусных штаммов розы**

Сорт	№ среды	№ штамма	Массовая доля экстрактивного масла, %	Массовая доля основных компонентов экстрактивного масла, %
Крымская Красная	МС324	188-1	0,0004	линалоол-23%, линалилацетат-17%
		261-1	0,0056	линалилацетат-61%, линалоол-27%
	МС339	855-2	0,0008	линалилацетат-61%, линалоол-27%
		158-1	0,0108	линалилацетат-49%, линалоол-16%, β-ФЭС-9%, цитронеллол-5%, нерол-2%
	МС334	858-1	0,0004	линалилацетат-65%, линалоол-25%
		860-1	0,0090	линалилацетат-60%, линалоол-20%
	МС340	154-3	0,0052	линалилацетат-13%, линалоол-8%
		855-5	0,0004	линалилацетат-29%, линалоол-25%
МС319	154-2	0,0025	линалилацетат-64%, линалоол-21%	
Лань	МС323	450-3	0,0081	линалилацетат-36%, β-ФЭС-16%, линалоол-12%, цитронеллол-5%, гераниол-8%, нерол-3%
	МС324	420	0,0029	линалилацетат-54%
	МС326	122-1	0,0021	линалилацетат-52%, линалоол-23%
	МС343	118-2	0,0140	линалилацетат-27%, β-ФЭС-26%, линалоол-11%, гераниол-10%, цитронеллол-4%, нерол-3%
Мичуринка	МС340	549-20	0,0010	линалилацетат-44%, линалоол-32%
		539-10	0,0106	линалилацетат-53%, линалоол-18% β-ФЭС-9%
	МС342	549-23	0,0012	линалилацетат-61%, линалоол-24%
		539-12	0,0095	линалилацетат-52%, линалоол-18% цитронеллол-5%
	МС339	538-8	0,0149	линалилацетат-55%, цитронеллол-6%
Свежен	МС338	654-2	0,0359	линалилацетат-43%, β-ФЭС-17%, линалоол-12%, цитронеллол-6%

Качественный анализ состава экстрагируемых из каллусов ароматических компонентов показал их отличие от состава эфирного масла из свежих цветков розы (см. табл. 5.2, рис. 5.4). В масле, полученном путем экстракции из цветков розы основным компонентом являлся β-ФЭС (65-74%), а монотерпеновые спирты составляли не более 20%, при этом преобладающим являлся гераниол (8-11%) [150]. У большинства изученных каллусных штаммов идентифицированы основные компоненты, характерные для эфирного масла целого растения: β-фенилэтиловый спирт (β-ФЭС) и монотерпеновые спирты – гераниол,

линалоол, цитронеллол, нерол. Кроме того, обнаружены линалилацетат и некоторые другие компоненты, не характерные для розового масла. Содержание различных компонентов в эфирном масле из цветков розы и каллусов значительно различалось. Следует отметить, что качественный состав масла значительно варьировал у различных каллусных штаммов. У основного числа проанализированных каллусных штаммов розы в эфирном масле доминировали линалилацетат (до 50-64%) и линалоол (до 20-35%), а содержание остальных монотерпеновых спиртов и  $\beta$ -ФЭС было незначительно. Вместе с тем, выделены штаммы, у которых соотношение компонентов было близко к нативному розовому маслу. Например, штамм № 118-2, у которого в эфирном масле содержалось 26%  $\beta$ -ФЭС, 27% линалилацетата, 11% линалоола, 10% гераниола, 4% цитронеллола и 2% нерола (см. рис. 5.4).



**Рис. 5.4** Хроматограммы розового масла, выделенного из цветков интактного растения (а) и каллусов 6-го пассажа сорта Крымская Красная (штамм № 158-1) (б), сорта Лань (штамм № 118-2) (в) и сорта Мичуринка (штамм № 539-10) (г)

Основные пики: 1 – линалоол; 2 – линалилацетат; 3 – внутренний стандарт (нонанол); 4 – цитронеллол; 5 – нерол; 6 – гераниол; 7 – стеароптен; 8 –  $\beta$ -ФЭС. Ось абсцисс – время удерживания, мин.

Ранее некоторые исследователи представили данные, свидетельствующие о способности каллусных культур *R. damascena* [542] и *R. gallica* [100] синтезировать монотерпеновые спирты и  $\beta$ -ФЭС, характерные для розового эфирного масла. В работе С.А. Киреевой с соавторами установлено, что соотношение различных компонентов в эфирном масле, полученном из каллусов розы, отличалось от масла, полученного из лепестков, и зависело от пассажа [100]. В то же время D.V. Vanthorpe с соавторами показали, что в каллусных и суспензионных культурах, полученных из лепестков, чашечек и стебля, у *R. damascena* монотерпены практически не накапливались, но обнаружили ключевые ферменты, необходимые для их синтеза [264]. Иранские ученые в каллусах *R. damascena*, полученных из стебля и лепестков, также не выявили монотерпенов [335]. В нашей работе показана возможность биосинтеза в каллусных культурах розы отдельных компонентов эфирного масла, отличающихся по составу от масла растения, при этом содержание экстрактивного масла было гораздо ниже, чем в лепестках. Полученные данные позволяют предположить, что в каллусной культуре розы на интенсивность накопления и состав эфирного масла в большей мере влияли штаммовые, чем сортовые различия. В большинстве исследований, посвященных проблемам биосинтеза эфирного масла *in vitro*, отмечается значительное снижение содержания эфирного масла по сравнению с растением и синтез лишь отдельных или неспецифичных для этого растения компонентов эфирного масла [97, 178, 182, 267, 541]. Следует отметить, что биосинтез эфирного масла у розы не был обусловлен необходимостью определенного уровня дифференцировки каллусной ткани, также как у мяты [178], ириса [6], ромашки [182] и полыни [272]. По-видимому, это позволяет использовать культуру изолированных клеток розы в качестве альтернативной модельной системы при изучении закономерностей маслообразовательного процесса, что было весьма эффективным у некоторых видов растений [26, 97, 178, 263, 541].

### **5.3 Использование культуры изолированных зародышей для получения гибридов розы эфиромасличной**

Основным методом в селекции розы эфиромасличной является гибридизация с последующим индивидуальным отбором форм, обладающих ценными хозяйственными признаками [150]. Большинство выращиваемых в России сортов (Аура, Лань, Лада, Радуга, Золушка) получены с использованием межсортовой или межвидовой гибридизации,

что обуславливает их сложную генетическую природу. Так, гибрид сортов Белая и Мичуринка стал родоначальником сорта Лань, а сорт Радуга – это гибрид сортов Весна (*R. damascena* Mill. x *R. gallica* L.) и Крымская Красная (*R. gallica* L.) [164]. Однако при гибридизации селекционеры часто сталкиваются с рядом проблем, главными из которых являются низкая завязываемость семян и высокая гибель гибридных зародышей [150, 188].

Эффективной клеточной технологией, позволяющей преодолеть эти трудности и повысить выход гибридных проростков, является культура изолированных зародышей (эмбриокультура). Это достаточно распространённый прием, многие годы широко используемый в различных селекционных программах сельскохозяйственных растений для получения гибридов, сочетающих признаки разных видов. В Никитском ботаническом саду под руководством А.И. Здруйковской-Рихтер активно проводились работы с зародышами плодовых растений [83]. Культуру зародышей использовали также для преодоления нескрещиваемости у баклажана [239], персика [457], банана [589] и получения многих других межродовых и межвидовых гибридов растений [3, 94, 134, 160].

Метод культуры изолированных зародышей нашел применение и в селекции эфиромасличных растений. Так, с использованием эмбриокультуры у шалфея получены межвидовые гибриды культурных сортов *Salvia sclarea* L. (С-785 и С-1122) с дикорастущими видами *S. scabiosifolia* Lam., *S. aethiopsis* L., *S. grandiflora* Etling [180, 197]. У розы эфиромасличной при межсортовых (межвидовых) скрещиваниях была выявлена постгамная несовместимость, которая приводила к гибели зародышей на ранних стадиях развития и низкой всхожести гибридных семян [188]. Для преодоления несовместимости и увеличения выхода гибридных зародышей ранее был разработан способ, основанный на культивировании изолированных зародышей в условиях *in vitro*, позволивший получить гибриды по 10 комбинациям скрещивания [188]. Однако рекомендованная в данной работе питательная среда Рандольфа и Кокса не подходила для культивирования зародышей ряда других гибридных комбинаций. В связи с этим изучено развитие изолированных зародышей розы с использованием широкого спектра комбинаций скрещивания и подобрана более универсальная питательная среда для их культивирования [198, 199, 606].

В проведенных экспериментах установлено, что в большинстве

вариантов скрещивания завязывалось незначительное количество семян (не более 3 штук на циннародий при наличии 25-50 семян). Поэтому получение гибридных проростков розы традиционным способом, как правило, малоэффективно. Так, в гибридной комбинации 'Весна' × 'Крымская Красная' из 45 семян было получено 2 проростка (4,4%), а в комбинации 'Украина' × 'Радуга' – ни одного. Применение метода эмбриокультуры позволило увеличить выход гибридных проростков. Изолированные гибридные зародыши в течение двух месяцев культивировали на агаризованной питательной среде при 4-6°C. За это время у части зародышей семядоли поднимались над поверхностью питательной среды и появлялся корень. Затем пробирки переносили в культуральную комнату, где из зародышей через 1-2 недели развивался побег и формировались листья (рис. 5.5).

**Рис. 5.5 Развитие гибридных зародышей розы эфиромасличной в культуре *in vitro***



Для определения оптимальной питательной среды, пригодной для получения проростков различных гибридных комбинаций, изучено влияние состава пяти сред на выход гибридных растений пяти комбинаций скрещивания (рис. 5.6). Установлено, что на питательных средах Брукса-Хауфа, Рандольфа и Кокса и Мурасиге и Скуга зародыши проросли и были получены растения в некоторых гибридных комбинациях, при этом выход растений не превышал 17,4%. Питательная среда Риджвена оказалась непригодной для прорастания зиготических зародышей. При её использовании гибридные растения не удалось получить ни в одной комбинации скрещивания. На модифицированной питательной среде Рандольфа и Кокса (МРК) [199] из зародышей всех изученных комбинаций скрещивания были получены растения. Максимальный выход гибридных растений на этой среде отмечен в

комбинации ‘Украина’ × ‘Радуга’ (31,9%). Этот показатель у других комбинаций колебались от 13,9 до 24,3%. При использовании других гибридных комбинаций использование питательной среды МРК также позволило получить лучшие результаты, поэтому ее можно рекомендовать для получения гибридов розы *in vitro*.

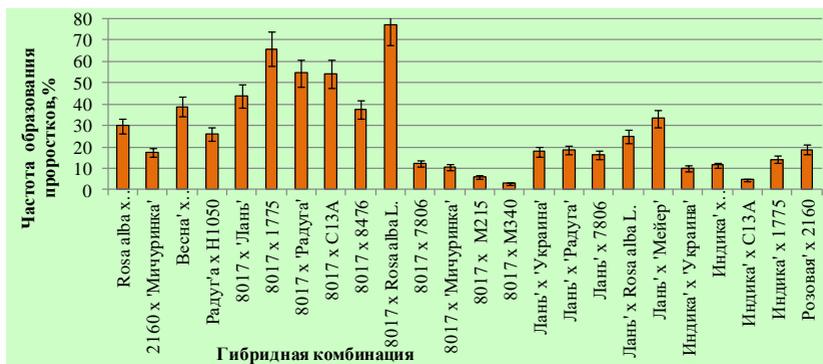


**Рис. 5.6** Влияние состава питательной среды на частоту образования проростков в культуре зародышей розы эфиромасличной

Существенное влияние на частоту образования гибридных растений в эмбриокультуре розы оказывал не только состав питательной среды, но и генотип родительских форм, участвующих в скрещиваниях. На рис. 5.7 представлены данные по некоторым, из более 50 изученных гибридных комбинаций розы эфиромасличной, которые свидетельствуют о влиянии генотипа на выход растений [198]. При этом максимальная частота образования проростков (43,8-76,9%) наблюдалась в комбинациях, где в качестве материнской формы использовали селекционный образец №8017. Следует отметить, что при реципрокных скрещиваниях с участием этого образца семена не завязывались. Невысокая частота формирования гибридных проростков отмечена в комбинациях, где в качестве материнской формы использовали сорт Лань (16,2 -18,6%) .

Проведённые исследования показали эффективность применения экспериментального подхода, основанного на культивировании изолированных зародышей *in vitro*, для получения гибридов по нескольким десяткам комбинаций скрещивания, которые представляют перспективный исходный материал для селекции розы эфиромасличной [606]. Использование метода эмбриокультуры позволяет интенсифицировать селекционный процесс за счет сокращения сроков получения гибридных

растений [188, 199]. Весь процесс развития растений из зародышей до стадии, на которой растения можно высаживать в сосуды с почвой или открытый грунт, составляет 4-6 месяцев. Происходит это за счет исключения фазы созревания плодов (1-1,5 месяца) и продолжительности стратификации (от 3-4 месяцев до 1-1,5 лет). Кроме того, количество гибридных проростков существенно увеличивается при культивировании зиготических зародышей *in vitro*. Изоляция зародышей на 40-50-й день после опыления позволяет частично избежать их гибели при прохождении дозревания плодов и стратификации. Так, частота образования проростков гибридной комбинации 'Весна' × 'Крымская Красная' составила 24,3%, что было в 5,5 раз выше, чем при использовании традиционного способа проращивания семян. В комбинации 'Украина' × 'Радуга' получены проростки с частотой 31,9%, в то время как при обычном способе проращивания проростков не получено.



**Рис. 5.7** Влияние комбинации скрещивания на частоту образования проростков в эмбриокультуре розы эфиромасличной (среда МРК)

#### 5.4 Изучение некоторых вопросов микроразмножения *in vitro*

Для повышения эффективности селекции розы эфиромасличной целесообразно применение клонального размножения *in vitro*, которое может быть использовано для быстрого размножения ценного селекционного материала, а также полученных в эмбриокультуре гибридов. У розы эфиромасличной эти методы, к сожалению, пока не получили широкого практического распространения. В литературе имеются сведения об исследованиях по микроразмножению видов ароматических роз, в основном касающиеся вопросов оптимизации

состава питательной среды для основных этапов размножения *R. damascena* [65, 290, 405, 450, 531]. В исследованиях болгарских и иранских ученых [388, 415, 485] рассмотрены отдельные аспекты микроразмножения *R. damascena*, однако представленные данные, особенно касающиеся составов питательных сред, весьма противоречивы. В ряде публикаций отмечалось влияние на эффективность размножения *in vitro* генотипа, консистенции питательной среды, освещения, количества субкультивирований [69, 423, 485]. В некоторых исследованиях вопросы микроразмножения видов и сортов розы эфиромасличной проанализированы с использованием физиолого-анатомических методов [139, 423, 454].

Выращиваемые в нашей стране сорта розы представляют сложные гибриды, полученные с участием видов *R. damascena*, *R. gallica*, *R. alba* что, учитывая известную высокую генетическую зависимость процессов каллусо- и морфогенеза *in vitro*, является дополнительной предпосылкой для проведения исследований по разработке технологии размножения розы эфиромасличной.

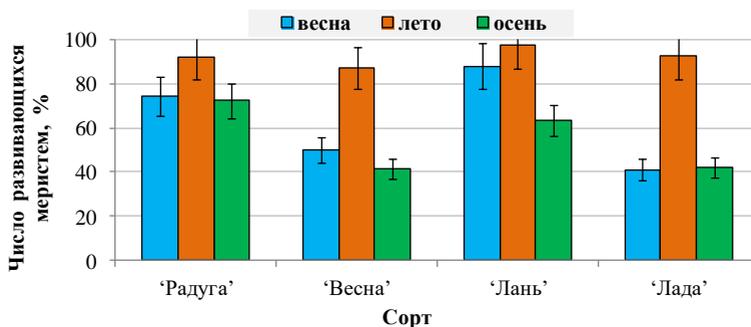


**Рис. 5.8 Развитие изолированных почек розы эфиромасличной сорта Радуга на первом этапе микроразмножения *in vitro***

Установлено, что при введении в асептическую культуру меристем с 2-3 листовыми зачатками через 10-12 сут на примордиях появлялась расчлененность краев, которая постепенно усиливалась, и формировалась первая листовая пластинка (рис. 5.8). Через 4-5 недель культивирования из меристем развивались небольшие укороченные микропобеги (длиной 5-10 мм), имеющие вид розетки с 1-3 листьями. Количество развивающихся эксплантов зависело от их размера и состава питательной среды. При анализе разных модификаций среды МС на 1-м этапе размножения розы лучшие показатели развития эксплантов (в

частности, длина побега и количество листьев) отмечены на среде МС, содержащей 0,5 мг/л БАП, 0,5 мг/л ГК<sub>3</sub> и 2% глюкозы [68]. Сравнение эксплантов разного размера показало, что количество развившихся эксплантов из почек длиной 0,5-1,0 мм достигало 61,5%, а из почек длиной 1,0-2,0 мм – 92,9%.

Развитие меристем розы в значительной степени зависело от сезона введения и сорта. Как видно из данных, представленных на рис. 5.9, наиболее благоприятным временем для введения в культуру был летний период. Число развивающихся эксплантов в это время у всех сортов достигало 87,1-97,5%. Осенью этот показатель был минимальным и колебался от 41,7 до 72,2%, в зависимости от сорта. При анализе морфометрических показателей развития меристем у сортов Лань и Весна наблюдали повышение частоты множественного побегообразования и числа почек летом по сравнению с другими сезонами. Однако у сорта Радуга формирование адвентивных почек и микропобегов более активно проходило в осенний период [68].

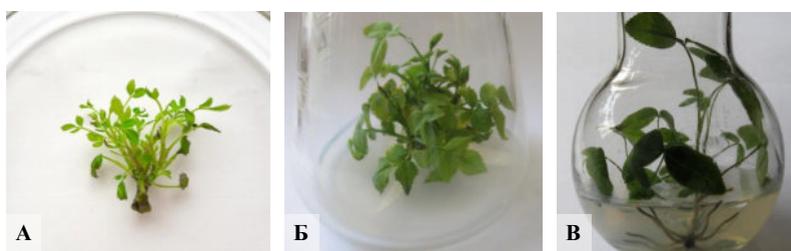


**Рис. 5.9** Влияние сезона введения в культуру *in vitro* и сорта на число развивающихся меристем розы эфиромасличной

Следует отметить, что представленные данные по влиянию сезона на развитие меристем розы эфиромасличной отличаются от результатов, полученных при использовании в качестве донорных растений из коллекции розы, выращиваемой на Южном берегу Крыма в Никитском Ботаническом саду [139]. В условиях ЮБК лучшими сроками отбора и введения эксплантов в культуру были февраль-март, когда частота развития меристем достигала 92-100 %, тогда как в летне-осенний период этот показатель не превысил 10-20 %. В наших исследованиях

при использовании растений розы, выращенных в Предгорной зоне Крыма, наоборот, в летний период получено максимальное число развивающихся эксплантов. Данные факты свидетельствуют о значительном влиянии на развитие меристем *in vitro* не только сезона изоляции экспланта, но и условий выращивания исходных растений (что особенно важно при использовании в качестве исходных полевых растений). По-видимому, такая морфогенетическая реакция обусловлена физиологическим состоянием органа растения и выделяемого из него экспланта.

Полученные на 1-м этапе размножения из меристем укороченные побеги, имеющие вид микророзеток, через 4-5 недель культивирования пересаживали на свежую питательную среду. В дальнейшем, на этапе собственно микроразмножения, из таких розеток листьев развивались пазушные и адвентивные побеги с укороченными междоузлиями, а также побеги с 3-5 нормальными междоузлиями, которые можно использовать для микрочеренкования (рис. 5.10 А, Б). При микрочеренковании побеги разделяли на сегменты с 1 узлом длиной 5-7 мм. Поэтому для размножения розы целесообразно применять 2 метода – индукцию множественного побегообразования и микрочеренкование побегов с хорошо развитыми междоузлиями, что позволяет получить больше эксплантов для дальнейшего размножения и повысить коэффициент размножения. При подсчете коэффициента размножения у розы учитывали все экспланты для размножения, как розетки с 3-5 листьями, так и микрочеренки с 1 узлом.



**Рис. 5.10 Развитие микророзеток на втором этапе микроразмножения (А, Б); укоренение *in vitro* побегов розы эфиромасличной (В)**

Исследовано влияние состава питательной среды на развитие эксплантов (сегментов стебля с 1 узлом) на 2-м этапе размножения *in vitro*

на примере сорта Лань (табл. 5.3). Поскольку в предварительных опытах была показана большая эффективность БАП по сравнению с кинетином, в данном эксперименте преимущественно анализировали среды, содержащие в качестве цитокинина БАП.

**Таблица 5.3 Влияние состава питательной среды на развитие эксплантов розы сорта Лань на 2-м этапе микроразмножения *in vitro***

Гормональные добавки в питательной среде МС (мг/л)	Количество побегов, шт./эксплант	Длина побега, мм	Частота множественного побегообразования, %	К.Р.
БАП (1,0)+ГК <sub>3</sub> (0,1), инозит (100), сахароза 2%	2,0±0,3	5,1±0,4	42,7±2,7	5,9±0,5
БАП (1,0)+ГК <sub>3</sub> (0,1), инозит (200), сахароза 2%	1,7±0,2	7,2±0,6	48,1±2,4	5,8±0,3
БАП (1,0), инозит (250), сахароза 2%	1,2±0,1	6,7±0,4	11,8±1,5	6,2±0,4
БАП (2,0)+ИУК (0,5), инозит (100), сахароза 2%	2,2±0,3	7,5±0,7	67,5±7,5	7,4±0,4
БАП (1,0+ГК <sub>3</sub> (0,1)+ИУК (0,5), инозит (200), глюкоза 2%	2,0±0,2	12,7±1,2	57,1±7,1	8,0±0,3
БАП (1,0), инозит (200), глюкоза 2%	1,8±0,2	12,7±1,4	46,4±3,6	8,1±0,4
БАП (2,0)+ГК <sub>3</sub> (0,1), инозит (200), глюкоза 2%	2,8±0,3	8,3±1,0	70,0±6,2	7,8±0,6
БАП (0,5)+ГК <sub>3</sub> (0,5), инозит (100), глюкоза 2%	1,9±0,2	16,5±1,1	58,6±1,4	8,3±0,5
Кинетин (1,0)+ГК <sub>3</sub> (0,1), инозит (200), глюкоза 2%	1,4±0,2	9,8±0,5	19,6±2,3	5,7±0,4
БАП (1,0)+ГК <sub>3</sub> (0,1), инозит (200), глюкоза 2%	2,4±0,2	11,7±1,1	72,7±6,1	9,0±0,5
БАП (1,0)+ГК <sub>3</sub> (0,1), инозит (100), глюкоза 2%	2,3±0,3	8,7±0,5	72,2±8,2	7,5±0,4
БАП (1,0)+ГК <sub>3</sub> (0,1), инозит (300), глюкоза 2%	2,2±0,2	11,1±1,4	59,1±4,5	7,2±0,4

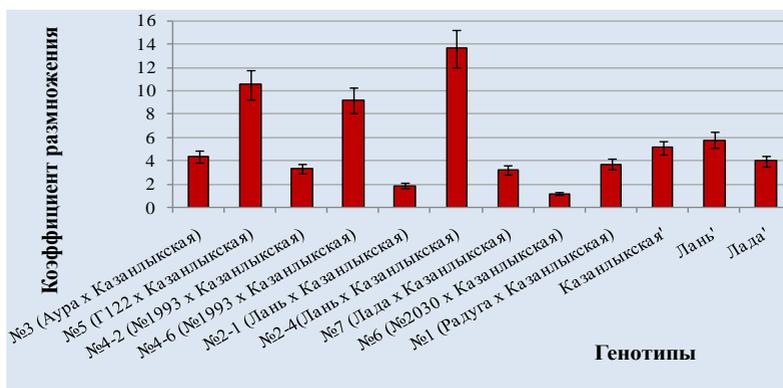
При сравнении разных концентраций БАП (0,5-2,0 мг/л) установлено, что низкая концентрация 0,5 мг/л способствовала удлинению побегов, концентрация 2,0 мг/л – повышению частоты множественного побегообразования. Однако коэффициенты размножения на этих средах достоверно не различались. При повышении концентрации БАП до 3-4 мг/л развивалось до 50-65% оводненных побегов. Хотя

некоторые исследователи для размножения *R. damascena* рекомендовали питательные среды с введением 3-4 мг/л БАП [388, 485].

Анализ представленных в табл. 5.3 данных показал целесообразность введения в питательную среду, наряду с БАП, также гибберелловой кислоты. Положительное влияние на К.Р. оказало увеличение концентрации инозита до 200 мг/л. Хотя дальнейшее повышение его содержания до 300 мг/л вызвало снижение частоты множественного побегообразования до 59,1%, а К.Р. – до 7,2. При добавлении в состав среды 0,5 мг/л ИУК отмечали небольшое повышение К.Р. до 7,4-8,0. Однако на этих питательных средах у основания побегов иногда наблюдали развитие каллуса, что является нежелательным явлением при микроразмножении, так как при индукции морфогенеза из него могут появиться регенеранты с соматональными изменениями. При использовании в составе питательной среды в качестве углевода глюкозы (вместо сахарозы) наблюдали тенденцию повышения всех изучаемых показателей. Введение в питательную среду в одинаковых концентрациях (0,5 мг/л) БАП и ГК<sub>3</sub> способствовало максимальному в опыте увеличению длины побега до 16,5 мм, при этом К.Р. составил 8,3. Однако при этом отмечали развитие оводненных побегов с частотой 30,9%. Максимальную частоту множественного побегообразования (72,7%), и коэффициент размножения (9,0) на 2-м этапе размножения обеспечивала среда МС с 1,0 мг/л БАП, 0,1 мг/л ГК<sub>3</sub>, 200 мг/л инозита и 2% глюкозы.

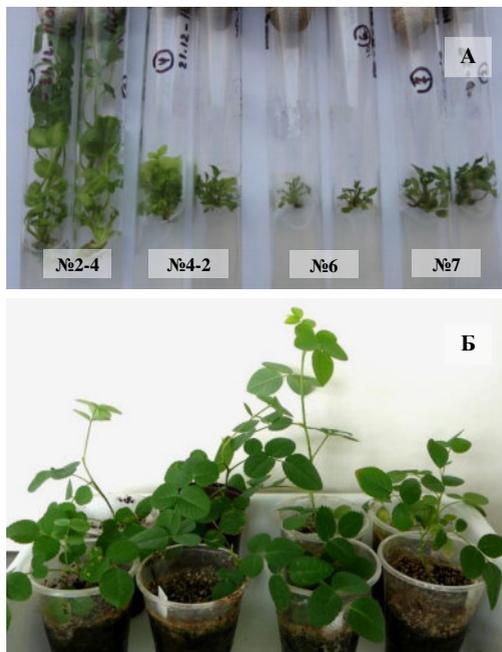
Эту питательную среду использовали для размножения других сортов и образцов розы, а также полученных в эмбриокультуре гибридов. Следует отметить, что микроразмножение гибридов, полученных в культуре изолированных зародышей, можно начинать сразу со 2-го этапа (собственно размножение). Для этого развивающиеся из зародышей пробирочные растения черенковали в асептических условиях и сегменты стебля с 1 узлом переносили на среду для размножения. Эффективность микроразмножения розы *in vitro* в значительной степени зависела от генотипа. Коэффициент размножения (рис. 5.11), количество побегов и другие морфометрические параметры варьировали у разных сортов, комбинаций скрещивания и у гибридов в пределах одной комбинации скрещивания. Например, у полученных в эмбриокультуре гибридов комбинации 'Белая'×'Казанлыкская' коэффициент размножения в первом субкультивировании варьировал от 1,0 до 12,0. На рис. 5.12 (А) показано развитие микропобегов у гибридов разных комбинаций скрещивания на 2-м этапе микроразмножения.

Микрочеренкование на втором этапе, как известно, можно проводить неоднократно для получения необходимого числа растений, поэтому важным вопросом является изучение морфогенеза эксплантов в течение нескольких циклов субкультивирования. Для разных сортов и гибридов розы эфиромасличной было показано повышение коэффициента размножения к 3-4-му пассажам [68, 69].



**Рис. 5.11 Коэффициент размножения *in vitro* у гибридов разных комбинаций скрещивания и исходных сортов розы эфиромасличной**

Поскольку на втором этапе размножения у розы не наблюдали индукции ризогенеза, для получения растений необходимо использовать третий, традиционный для микроразмножения этап – укоренение *in vitro*. Показано, что для изучаемых нами сортов и гибридов розы более эффективной для укоренения микропобегов была среда  $\frac{1}{2}$ МС, дополненная 0,5 мг/л НУК [74]. На этой питательной среде, в зависимости от сорта, развивалось в среднем 5-8 корней длиной 18-25 мм (рис. 5.10 В). Судя по литературным данным, для ризогенеза *in vitro* у розы эфиромасличной обычно используют агаризованные питательные среды с добавлением различных ауксинов – ИМК, НУК [258, 405, 415, 531]. Вместе с тем имеются сведения о применении для укоренения микропобегов безгормональных или жидких сред, двухстадийного культивирования [405, 485], а также об индукции ризогенеза *in vivo* [257, 405]. В некоторых работах для укоренения *in vitro* *R. damascena* использовали снижение концентрации солей в среде МС [246, 258, 531], добавление активированного угля [246].



**Рис. 5.12** Микроразмножение *in vitro* (А) и адаптация *in vivo* (Б) полученных в эмбриокультуре гибридов розы эфиромасличной.

№2-4 – ‘Лань’ х ‘Казанлыкская’; №4-2 – 1993 х ‘Казанлыкская’; №6 – 2030 х ‘Казанлыкская’; №7 – ‘Лада’ х ‘Казанлыкская’

После укоренения *in vitro* растения переносили в субстрат (торф: перлит – 1:1) и адаптировали к условиям выращивания *in vivo* в течение 2-3 недель с использованием традиционных приемов (рис. 5.12 Б). Количество адаптированных растений в значительной степени зависело от генотипа. У большинства сортов и гибридов розы эфиромасличной частота адаптации была в пределах 65,5-92,0%, однако у отдельных гибридов не превышала 30-40%. Адаптированные растения через 1,5-2 месяца пересаживали в сосуды с почвой, а затем в поле. Проведенные исследования позволили разработать методику получения гибридов и клонального микроразмножения розы эфиромасличной [199], которая используется при создании нового исходного селекционного материала в НИИСХ Крыма (рис. 5.13).



**Рис. 5.13** Схема получения гибридов розы эфиромасличной с использованием эмбриокультуры и микроразмножения *in vitro*

## ГЛАВА 6

### ГЕРАНЬ ЭФИРОМАСЛИЧНАЯ (*PELARGONIUM* SPP.)

Герань эфиромасличная относится к роду *Pelargonium* семейства Geraniaceae. Под этим общим названием объединяют несколько видов, которые могут использоваться для получения эфирного масла, – *Pelargonium roseum* Willd., *P. graveolens* Ait., *P. odoratissimum* Ait., *P. radula* L’Herit, *P. capitatum* Ait., *P. fragrans* Willd., а также гибриды на их основе [114, 183]. Эфиромасличная герань является ценным ароматическим растением, широко возделываемым в Грузии, Армении, Таджикистане, Франции, Алжире и других странах мира. Сложное гибридное происхождение многих видов и сортов эфиромасличной герани неоднократно обсуждалось в ряде работ [114, 194]. Тем не менее, даже по поводу основного возделываемого в странах СНГ сорта Розовая нет единой точки зрения, так как его часто относят к виду *P. roseum*, хотя имеются данные о его гибридном происхождении с участием *P. capitatum* и *P. radula* [183]. Гераниевое эфирное масло, основными компонентами которого являются цитронеллол, гераниол и линалоол, используется в парфюмерном и косметическом производстве, пищевой промышленности. Благодаря противомикробным, противогрибковым, анестезирующим, противовоспалительным и спазмолитическим свойствам, эфирное масло этого вида активно применяется в медицине [292]. Чаще всего для его получения выращивают *P. roseum* – многолетний травянистый полукустарник с одревесневшей нижней частью стебля и ветвей. Эфирное масло у этого растения содержится в эфиромасличных железках, расположенных главным образом на листьях. Для нормального развития герани требуется субтропический климат, так как снижение температуры ниже  $-4^{\circ}\text{C}$  вызывает подмерзание надземной части. Поэтому во многих странах это теплолюбивое растение выращивают в качестве однолетней культуры, а в зимний период укорененные саженцы хранятся в теплицах [194]. В селекции герани в основном используются традиционные методы гибридизации, а для размножения – черенкование кустов [114]. Методы клеточной инженерии способствуют повышению эффективности селекции и решению некоторых проблем, в частности, позволяют преодолеть стерильность при отдаленной гибридизации, увеличить продуктивность, содержание и качество эфирного масла.

Биотехнологические исследования видов рода *Pelargonium* в основном касаются вопросов микроразмножения *in vitro* [162, 293, 369, 570,

344, 481, 515, 576], индукции каллусо- и морфогенеза [282, 323, 475, 535], получении в клеточных культурах компонентов эфирного масла [240, 283, 403]. Однако в этих работах недостаточно изучены многие вопросы, касающиеся регенерации растений *in vitro*, индукции соматоклональной variability, отсутствуют данные о разработке методов клеточной селекции и других биотехнологий. Это послужило основанием для изучения особенностей каллусо- и морфогенеза, разработки системы создания новых форм и микроразмножения эфиромасличной герани *in vitro*. Материалом для исследования служили выращиваемые в странах СНГ (Таджикистане, Армении, Грузии) сорта Розовая, Аист, Крунк, Регар, Душистая, Людмила и селекционные образцы (№№ 51, 14, 14/4), которые имеют сложное гибридное происхождение и были получены при участии видов *P. roseum* Willd., *P. radula* (Cav.) L'Herit., *P. capitatum* (L.) Ait., *P. graveolens* (Jacq.) L'Herit. [114].

### **6.1 Оптимизация режимов получения и характеристика каллуса**

В предварительных исследованиях у всех изученных сортов герани была показана возможность индукции каллусогенеза из эксплантов различных вегетативных (стебель, лист, черешок, корень) и репродуктивных (чашелистик, лепестки венчика, завязь, пестик) органов растений. Высокая частота образования каллуса при введении в культуру *in vitro* сегментов стебля и черешка, а также их доступность в течение всего периода вегетации обусловили преимущественное использование этих эксплантов в дальнейших экспериментах. При эксплантации на питательную среду сегментов черешка или стебля через 7-10 суток начинал формироваться рыхлый светло-серый, почти прозрачный водянистый каллус, при этом иногда наблюдали начальные этапы прямого или непрямого морфогенеза. Одним из основных факторов, влияющих на развитие эксплантов и индукцию образования каллуса, был состав питательной среды. При культивировании сегментов черешка листа на безгормональной среде МС или при добавлении одних ауксинов каллусогенез не наблюдали, или с низкой частотой развивался небольшой бурый каллус (табл. 6.1). При введении в среду одного из цитокининов (Кин, БАП) каллус формировался с высокой частотой (до 85-90%), и этому процессу сопутствовало образование почек и в дальнейшем побегов. Для эффективной индукции каллуса, как неморфогенного, так и морфогенного, необходимо одновременное присутствие в среде МС цитокинина и ауксина. При этом на некоторых вариантах сред отмечали

формирование почек (МС160, МС1634), ризогенез (МС142), или одновременное развитие корней и побегов (МС141). Частота образования каллуса на этих средах была довольно высокой (58-95%) и у сорта Розовая и Крунк достоверно не различалась. Наиболее эффективной средой для получения неморфогенного каллуса у герани была среда МС с добавлением 1,0 мг/л 2,4,5-Т и 0,5 мг/л Кин, на которой отмечена максимальная частота каллусогенеза (до 95%). У других изученных сортов на этой среде при введении в культуру эксплантов стебля и черешка также получали обильно растущий каллус с частотой до 75-96%.

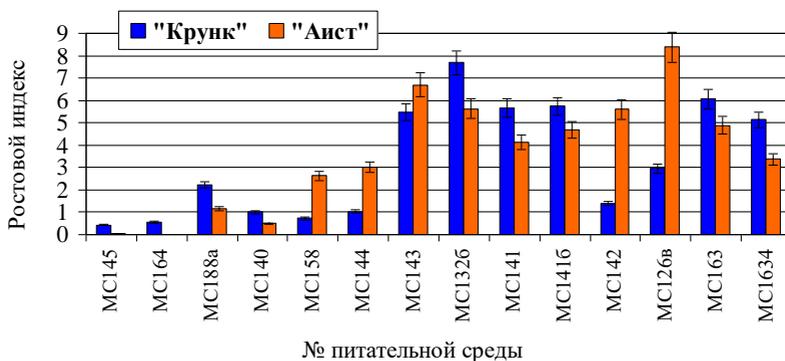
**Таблица 6.1 Влияние гормонального состава питательной среды на частоту индукции каллуса (%) из эксплантов черешка у герани**

№ питательной среды	Гормональные добавки в среде МС, мг/л	Сорт	
		Розовая	Крунк
МС 145	б/г	0	0
МС164	ИУК (1,0)	5,0±2,1	0
МС188а	НУК (1,0)	16,7±3,5	23,1±5,1
МС140	2,4-Д (1,0)	5,3±2,1	15,0±3,9
МС158	2,4,5-Т (1,0)	26,6±4,5	14,5±3,8
МС144	2,4,5-Т (2,0)	33,3±4,6	15,7±3,8
МС143	Кин (0,5)	90,0±3,3*	85,2±4,0*
МС1326	БАП (0,5)	85,0±3,8*	80,9±4,9*
МС141	НУК (1,0)+Кин (0,5)	73,3±4,9***	66,7±5,8***
МС1416	НУК (2,0)+Кин (1,0)	80,0±4,9	73,3±6,1
МС142	2,4,5-Т (0,5)+Кин (0,1)	63,3±6,0**	58,8±5,9**
МС126в	2,4,5-Т (1,0)+Кин (0,5)	95,0±3,0	89,6±3,8
МС163	2,4,5-Т (1,0)+БАП (0,5)	82,5±4,9	80,0±5,1
МС1634	2,4,5-Т (1,0)+БАП (1,0)	75,0±5,1*	84,4±4,8*
МС160	НУК (1,0)+БАП (0,5)	89,5±3,9*	72,4±5,5*

\*побеогообразование; \*\*ризогенез; \*\*\*образование побегов и корней

Необходимым этапом многих клеточных технологий является длительное культивирование каллуса. Важную роль в этом процессе играет состав питательной среды, причем среда, оптимальная для индукции каллуса, не всегда подходит для его дальнейшего пассирования, что было продемонстрировано и у некоторых видов ароматической герани [282]. Для оптимизации состава среды использовали полученные из черешка неморфогенные каллусы 3-го пассажа, которые переносили на различные модификации среды МС (рис. 6.1). Установлено, что для культивирования каллуса герани у обоих сортов необходимо присутствие

цитокинина и ауксина, что способствовало хорошему росту каллусных культур. При этом на некоторых питательных средах (МС141, МС142, МС163, МС160), также как и при индукции каллуса, наблюдали формирование почек и побегов. Максимальный прирост неморфогенного каллуса обеспечило введение в состав среды 1,0 мг/л 2,4,5-Т и 0,5 мг/л БАП или Кин.



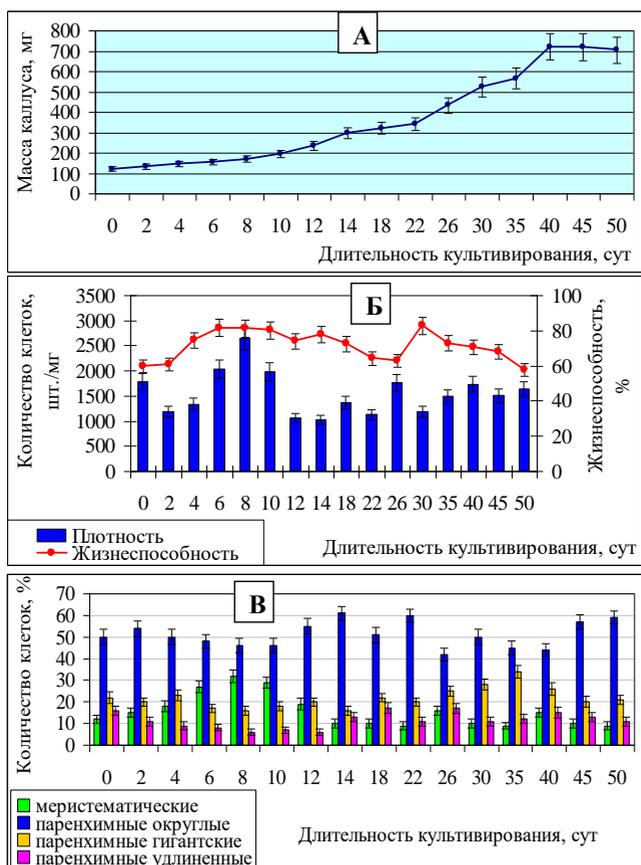
**Рис. 6.1. Влияние гормонального состава питательной среды МС и сорта на ростовой индекс каллуса герани, полученного из экспланта черешка. Состав сред – см. табл. 6.1**

Интенсивность роста каллуса и оптимальная среда зависели от генотипа – у сорта Аист для длительного культивирования необходимо использовать среду МС126в (РИ 8,4), а у сорта Крунк МС163 (РИ 6,1) (см. рис. 4.1). У остальных изученных сортов (Розовая, Душистая, Регар) максимальный прирост каллуса обеспечила среда МС126в (РИ до 7-8). На этой среде хорошую пролиферацию каллуса наблюдали в течение 12-16 пассажей.

Имеющиеся литературные данные по получению каллусных культур герани довольно противоречивы и отличаются от полученных нами, что в значительной степени обусловлено использованием разных видов, сортов, эксплантов и условий выращивания растений. Так, каллусные ткани *P. graveolens* получали на среде МС с добавлением НУК и БАП [475], НУК и Кин [535], 2,4-Д и Кин [282], НУК, Кин и аденин [551], а для роста каллуса *P. roseum* использовали 2,4-Д и НУК [329].

Исследована динамика некоторых цитофизиологических показателей популяции культивируемых клеток герани в течение цикла

выращивания на примере полученного из черешка каллуса 8-го пассажа сорта Розовая (рис. 6.2). На протяжении цикла выращивания масса каллуса увеличилась в 7 раз, при этом в течение первых 4-х суток после пересадки на свежую питательную среду масса каллуса достоверно не изменялась, что соответствует лаг-фазе ростового цикла. В этот период количество разных типов клеток не изменялось. Вследствие низкой пролиферативной активности клеточной популяции происходило снижение плотности каллуса.



**Рис. 6.2.** Динамика изменения массы каллуса (А), плотности и жизнеспособности клеточной популяции (Б) и соотношения различных типов клеток (В) в цикле выращивания каллуса герани сорта Розовая

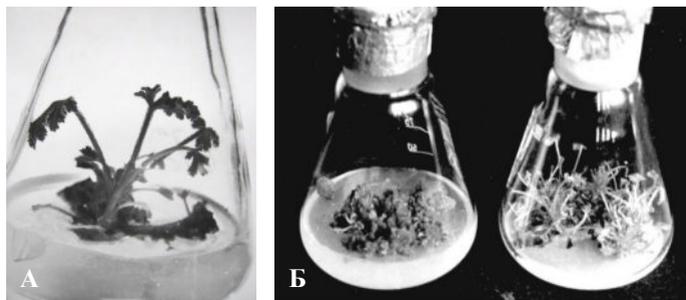
Переход в экспоненциальную фазу роста отмечен на 6-8-е сутки, когда достоверно увеличилась масса каллуса и повысилась жизнеспособность клеточной популяции (до 71-81%). Для этого периода характерно увеличение в 1,5 раза числа клеток меристематического типа и повышение из-за этого плотности каллуса, что косвенно свидетельствует об увеличении интенсивности делений. После завершения активных делений клетки переходили в фазу растяжения, что сопровождалось снижением плотности, наблюдаемым к концу второй недели культивирования, а также увеличением числа паренхимных клеток.

В начале четвертой недели культивирования, судя по динамике прироста массы каллуса, начиналась линейная фаза роста. На 26-е сутки вновь произошло повышение плотности каллуса, связанное с увеличением пролиферативной активности. Вследствие интенсивных делений возросло число клеток меристематического типа и жизнеспособность популяции (до 82,6%). Следует отметить у герани достаточно большое количество удлинённых и гигантских паренхимных клеток, достигающее в сумме на некоторых стадиях до 35-42% (см. рис. 4.2). Переход популяции каллусных клеток в стационарную фазу роста происходил на 40-е сут культивирования, когда прекращался достоверный прирост массы, стабилизировалась плотность каллуса. К концу цикла выращивания в популяции начинались процессы дегенерации, что привело к снижению жизнеспособности до 60-70% и возрастанию числа паренхимных округлых (57-59%) и гигантских клеток (21-25%).

## **6.2 Изучение особенностей индукции прямого и непрямого морфогенеза в культуре *in vitro***

Большинство клеточных технологий в значительной степени основано на тотипотентности растительных клеток *in vitro*, поэтому оптимизация режимов регенерации растений является важнейшим этапом их разработки. Судя по литературным данным, у разных видов герани возможна индукция как прямого [445, 622, 646], так и непрямого морфогенеза [181, 323, 427]. У изученных сортов Розовая, Аист и Крунок при культивировании сегментов стебля, черешка и листа на средах, содержащих только БАП или Кин, наблюдали индукцию прямого морфогенеза непосредственно из тканей эксплантов и формирование почек и адвентивных побегов (рис. 6.3). На среде МС, дополненной 0,5 мг/л БАП, у эксплантов стебля и черешка частота прямого морфогенеза достигала 84-100%, в зависимости от генотипа и экспланта.

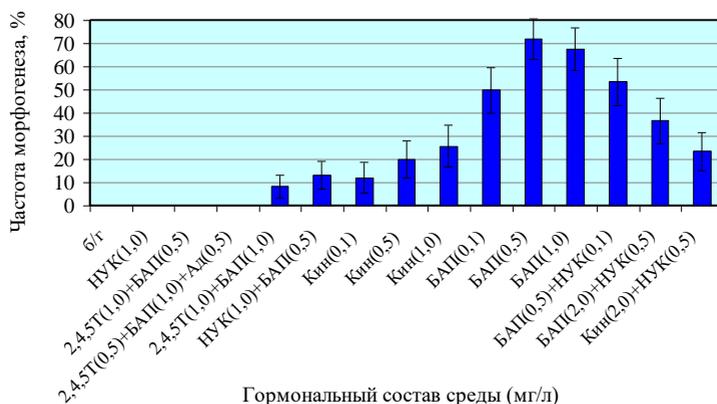
Из сегментов листьев адвентивные побеги регенерировали реже, с частотой до 45-56%. Имеются сообщения о возможности индукции прямого органогенеза у *P. roseum* на среде с Кин, БАП и НУК [488], а у *P. graveolens* – при использовании питательных сред, дополненных зеатином и НУК [372].



**Рис. 6.3. Индукция побегообразования из экспланта черешка листа (А) и из каллуса (Б) у герани сорта Розовая в культуре *in vitro***

Большее внимание в данной работе уделено изучению непрямого морфогенеза в длительно культивируемых каллусах, так как этот процесс можно использовать в клеточных технологиях создания генетически разнообразного материала, например, получения соматклонов, клеточной селекции. Для ряда сортов и образцов герани при использовании широкого спектра сред выявлена возможность индукции геммогенеза в каллусных культурах, полученных из разных эксплантов. В каллусе при индукции морфогенеза появлялись зеленые участки, из которых развивались почки и в дальнейшем побеги. На рис. 6.4 на примере каллуса сорта Розовая показана зависимость частоты морфогенеза от гормонального состава среды МС. При подборе питательной среды для индукции морфогенеза и регенерации растений неморфогенные каллусные культуры со среды для каллусогенеза (МС12бв) переносили на питательные среды МС различного гормонального состава. Высокая частота морфогенеза достигнута при введении в состав среды БАП, причем концентрация 0,5 мг/л обеспечивала максимальную эффективность этого процесса (72,2%). При использовании другого типа цитокинина (Кин) или при совместном введении в среду ауксина (2,4,5-Т или НУК) и цитокинина интенсивность индукции морфогенеза снижалась.

При цитологическом анализе морфогенных каллусов герани выявлены меристематические клеточные комплексы, из которых формировались апексы побегов, а также дифференциация эмбрионных клеток и эмбриоидов, что свидетельствует о наличии обоих типов морфогенеза. Судя по литературным данным, у видов герани эфиромасличной обнаружены различные типы морфогенеза в культуре *in vitro*. В частности, для *Pelargonium hortorum* сообщалось об индукции соматического эмбриогенеза при введении в среду ТДЗ и ацетилсалициловой кислоты [471]. В других работах в каллусных культурах *P. citriodorum*, *P. crispum*, *P. graveolens*, *P. australe*, *P. filifolium*, *P. quercifolium* описан органогенез [282, 502]. А.С. Cassells отмечал в каллусах *P. domesticum* x *P. hortorum* и эмбриоиды, и меристематические апексы, при этом он указывал на важную роль эндогенных ауксинов в регуляции морфогенеза [293]. Ряд исследователей также отмечали возможность индукции прямого морфогенеза из разных эксплантов у *P. roseum* и *P. graveolens* [372, 488, 535].



**Рис. 6.4** Влияние гормонального состава питательной среды МС на частоту индукции морфогенеза в каллусах герани сорта Розовая 2-го пассажа, полученных из черешка

Помимо состава питательной среды значительную роль в индукции морфогенеза у герани оказывали генотип и тип экспланта (табл. 6.2, рис. 6.5). Практически у всех изученных сортов и селекционных образцов в каллусных культурах листового, черешкового и стеблевого происхождения наблюдали морфогенез. Частота индукции морфогенеза

на большинстве питательных сред была достоверно выше при использовании эксплантов черешка или стебля по сравнению с листьями, и достигала 26-88%, в зависимости от сорта. Отмечены также значительные генотипические различия – наибольшая частота морфогенеза (63-72%) выявлена в каллусах сортов Розовая, Крунк, Душистая и № 51, а у образцов № 14 и 14/4 этот показатель не превышал 11,1% (см. рис. 6.5).

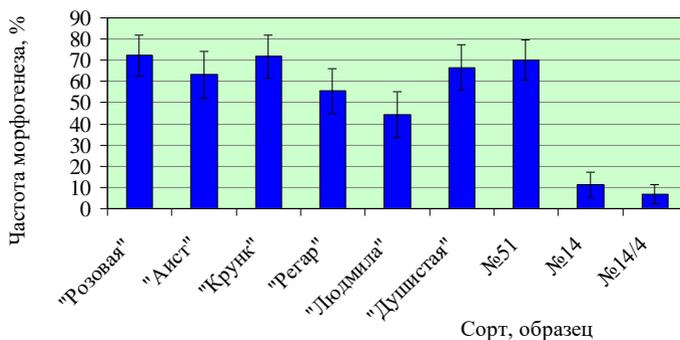
Следует отметить, что оптимальный состав морфогенной питательной среды зависел от сорта. У большинства генотипов лучшие результаты обеспечивала среда МС с 0,5 мг/л БАП, однако у сорта Людмила и № 14 максимальная индукция морфогенеза (до 62,6 и 26,2% соответственно) отмечена на среде, дополненной Кин (см. табл. 6.2). По литературным данным для ряда видов герани также показано варьирование морфогенетического потенциала в зависимости от сорта или вида растения [282, 323, 352, 551].

**Таблица 6.2 Влияние гормонального состава питательной среды, генотипа и типа экспланта на частоту индукции морфогенеза в каллусной культуре герани, %**

Гормональные добавки в среде МС, мг/л	Тип экспланта	Сорт, образец			
		Розовая	Крунк	Людмила	№ 14
Б/г	лист	0	0	0	0
	черешок	0	0	0	0
	стебель	0	0	0	0
Кин (0,5)	лист	23,4±4,2	16,7±3,5	28,3±4,3	0
	черешок	20,0±4,1	27,2±4,3	62,6±5,4	12,2±2,9
	стебель	57,1±5,2	29,4±4,6	52,6±5,1	26,2±4,2
БАП (0,5)	лист	38,9±4,9	66,7±5,1	10,0±3,3	4,7±1,9
	черешок	72,2±4,8	71,7±4,8	44,4±5,1	11,0±3,1
	стебель	88,2±3,9	61,1±5,0	34,4±4,8	20,9±3,9
Кин (2,0)+НУК (0,5)	лист	21,4±3,8	9,1±2,8	18,3±3,8	0
	черешок	23,5±4,1	16,7±3,5	31,7±4,2	4,3±1,9
	стебель	31,2±4,2	20,9±3,7	20,0±3,6	8,0±2,2

Проведенный 3-х факторный дисперсионный анализ показал, что основная роль в индукции непрямого морфогенеза у герани принадлежала составу питательной среды, большое влияние оказывали также генотип и взаимодействие этих двух факторов (доля влияния соответственно – 0,59,

0,14 и 0,13). Влияние типа экспланта не превысило 0,05, а остальных взаимодействий факторов 0,03.



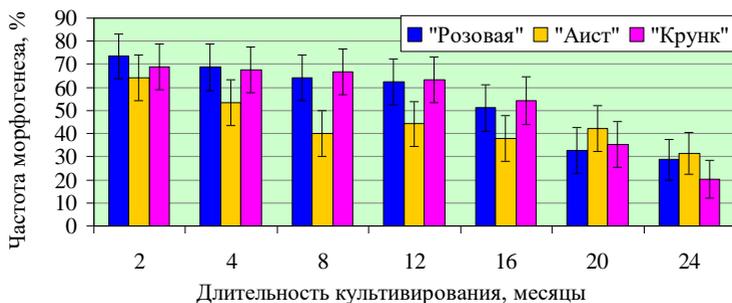
**Рис. 6.5 Влияние генотипа на частоту индукции морфогенеза в каллусе 2-го пассажа, полученном из черешка (среда МС+0,5мг/л БАП)**

При разработке клеточных технологий, позволяющих получать новые генотипы, важна не только высокая частота регенерации растений, но и способность каллусов сохранять морфогенетические потенции длительное время. Это обусловлено возрастанием генетической гетерогенности соматических клеток по мере их культивирования и, как следствие, увеличением уровня соматической вариабельности.

В процессе изучения каллусных культур различных сортов герани установлено, что они сохраняли способность к индукции морфогенеза достаточно длительное время, при этом частота морфогенеза постепенно снижалась и через 2 года составила 20,3-31,4% (рис. 6.6). В дальнейшем, в течение третьего года культивирования, частота появления морфогенных образований была низкой (не более 7-15%), и из почек развивались единичные растения.

В результате индукции морфогенеза в каллусах развивались побеги, которые для доращивания переносили на оптимизированную в предварительном опыте среду  $\frac{1}{2}$  МС с добавлением по 0,01 мг/л НУК, ИУК и 0,05 мг/л БАП. На этой среде через 3-4 недели формировались побеги длиной 30-40 мм с 6-8 листьями (рис. 6.7). Иногда у побегов герани спонтанно образовывались корни, однако для повышения эффективности ризогенеза их необходимо было переносить на среду с добавлением 0,1 мг/л НУК, на которой до 85-90% регенерантов

формировали корни. Проростки после укоренения переносили в торфо-перлитную смесь *in vivo* и выращивали с применением традиционных приемов адаптации, что обеспечивало приживаемость до 80% (см. рис. 6.7).



**Рис 6.6** Влияние длительности культивирования каллуса и сорта на индукцию морфогенеза *in vitro* у герани



**Рис. 6.7** Проростки, полученные из каллуса герани сорта Розовая *in vitro* (А); растения при адаптации *in vivo* (Б) и в вазонах в теплице (В)

Таким образом, для разных сортов и образцов герани показана возможность индукции прямого морфогенеза из различных эксплантов, а также непрямого морфогенеза из каллусных культур, частота которого зависела от генотипа растения, типа экспланта, гормонального состава питательной среды и пассажа. По литературным сведениям у *P. hortorum* регенерация в каллусах отсутствовала [551], тогда как в другом исследовании выявлена индукция побегообразования [502]. У видов ароматической герани (*P. graveolens*, *P. citriodorum*, *P. crispum*, *P. australe*, *P. filifolium*) способные к морфогенезу каллусы получали из эксплантов стеблей [282, 551], листьев [368], а у декоративных видов – из черешков

[293], верхушек побегов [323], семядолей и гипокотилей проростков [471]. Очень противоречивы данные о составе питательных сред для индукции морфогенеза в каллусных культурах – разные исследователи использовали добавление в среду зеатина [293], ТДЗ [381], НУК и БАП [282], зеатина и ИУК [323], Кин, 2ip и аденина [427].

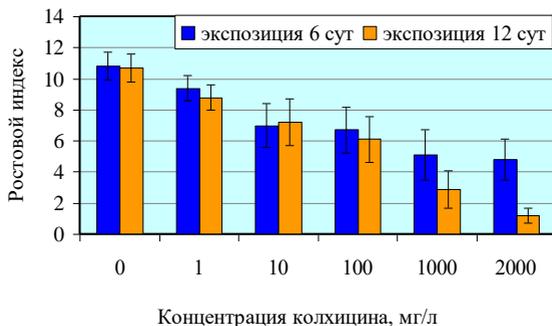
В нашей работе у каллусов, полученных из разных органов 9-ти генотипов эфиромасличной герани, показана способность к регенерации, которая сохранялась достаточно долго – не менее 2,5-3 лет. При этом наиболее эффективным было введение одного цитокинина (БАП или Кин). В работе J.T. Brown и B.V. Charlwood у эфиромасличных видов герани каллусы сохраняли морфогенетический потенциал в течение 1,5 лет [282], тогда как S.K. Pillai и A.C. Hildebrandt указывали на отсутствие регенерации уже после 6-го пассажа [502]. Выявленный высокий морфогенный потенциал, а также возможность регенерации при использовании разных эксплантов и сортов и четкая гормональная регуляция этого процесса делает эфиромасличную герань удобным объектом для разработки клеточных технологий.

### **6.3 Исследование влияния обработки колхицином на процессы каллусо- и морфогенеза в каллусной культуре**

Сочетание соматической изменчивости и индуцированного мутагенеза *in vitro* позволяет существенно увеличить частоту вариаций у регенерантов, а иногда и расширить спектр изменчивости [37, 191, 223, 573]. При разработке методических основ мутагенеза в культуре тканей для каждого нового вида растения необходимо подобрать тип и оптимальные дозы мутагена, объект обработки и фазы его развития. Среди разнообразных химических мутагенов в культуре тканей часто используется колхицин, в основном для полиплоидизации растений [549, 160, 111, 130, 363, 604], однако имеются сведения о получении при его действии анеуплоидов и других измененных форм растений [37, 111, 159, 255, 316, 467].

Исследования действия колхицина у герани проводили с использованием каллусных культур, поскольку был выявлен их высокий морфогенный потенциал. Кроме того, наряду с органогенезом, наблюдали соматический эмбриогенез, при котором значительно снижается вероятность получения химерных форм *in vitro*. При изучении действия колхицина использовали неморфогенные каллусы, которые культивировали на средах с различными его концентрациями, а затем

переносили на среду для каллусогенеза и определяли прирост биомассы (рис. 6.8). Установлено, что концентрации колхицина, начиная с 10 мг/л, вызывали достоверное снижение прироста массы каллуса. При этом ростовой индекс варьировал в зависимости от дозы и экспозиции от 7,2 до 1,2 (в контроле 10,5-10,7). Наиболее сильное угнетение роста происходило при культивировании каллусов 12 сут на среде с 2000 мг/л колхицина, после которого лишь половина трансплантов была способна к дальнейшей пролиферации, а у остальных наблюдали некроз.

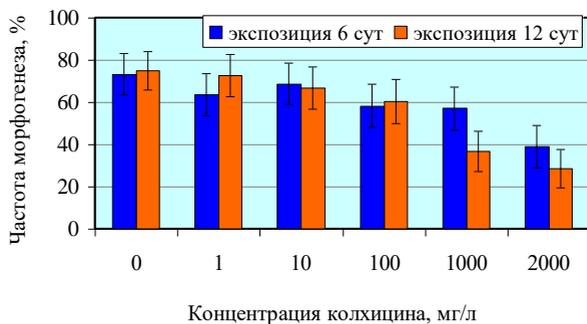


**Рис. 6.8** Влияние колхицина на прирост каллуса 3-го пассажа, полученного из эксплантов черешка, у герани сорта Розовая

Важной проблемой при определении оптимальных режимов мутагенного воздействия является сохранение регенерационной способности каллусных культур. Для получения измененных регенерантов необходимо, с одной стороны, обеспечить максимальный мутагенный эффект при сублетальных дозах мутагена, а с другой – получить жизнеспособные растения. Как видно из представленных данных, при переносе каллусов герани после обработки на среду для регенерации при всех испытанных режимах сохранялась высокая способность к индукции морфогенеза (рис. 4.10). При введении в среду 1000 мг/л (экспозиция 6 сут) и 2000 мг/л колхицина частота морфогенеза достоверно снижалась по сравнению с контролем.

В каллусных культурах после обработки колхицином при высоких концентрациях (1000-2000 мг/л), наряду со снижением способности к морфогенезу, наблюдали более медленное развитие побегов по сравнению с контролем и формирование аномальных проростков, которые плохо приживались *in vivo*. При максимальной концентрации 2000 мг/л

жизнеспособные растения не формировались. Поэтому для герани концентрацию колхицина 1000 мг/л, при которой получены единичные растения, можно считать сублетальной. В ряде работ отмечалось аналогичное угнетающее действие химических мутагенов на морфогенез и дальнейшее развитие полученных растений [12, 37, 149, 191, 223, 549].



**Рис. 6.9** Влияние колхицина на индукцию морфогенеза в каллусе 3-го пассажа, полученном из эксплантов черешка, у герани сорта Розовая

При анализе в течение 3 лет вегетативного потомства полученных в этом эксперименте регенерантов герани выявлены морфологические изменения как у растений, полученных из контрольных каллусов, так и после колхициновой обработки. Следует отметить, что значительное число измененных форм появлялось даже при минимальной концентрации колхицина 1 мг/л. Достаточно сложно оценить влияние различных концентраций колхицина на частоту возникновения мутантных форм, так как, наряду с морфологическими изменениями, возможно появление других мутаций. Однако полученные данные убедительно свидетельствуют о том, что в целом число регенерантов с морфологическими изменениями после обработки колхицином (57,1%) было в три раза выше, чем без обработки (18,2%). Кроме того, цитогенетический анализ этих регенерантов показал, что введение колхицина в питательную среду способствовало появлению большего, чем в контроле числа анеуплоидов [169].

Типы измененных признаков у регенерантов в контроле и после различных вариантов обработки колхицином были достаточно схожи и в основном касались габитуса куста, фертильности мужского гаметофита,

размера и формы листовой пластинки. При сублетальной концентрации колхицина 1000 мг/л получено несколько растений, которые отличались от исходного сорта Розовая. Так, у регенеранта № 2008,4 отмечены более крупные листья, утолщенный стебель, цветки большего размера с фертильными пыльниками и 72 хромосомы (у сорта – 56 хромосом).

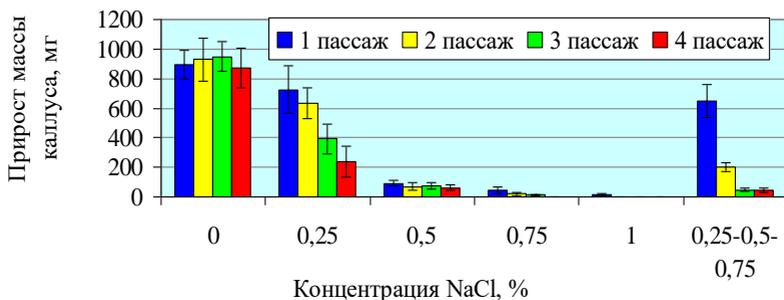
Для других испытанных сортов (Аист, Крунк) и типа экспланта (стебель) получены аналогичные данные о действии колхицина и показана возможность регенерации измененных форм. Полученные данные согласуются с некоторыми исследованиями, в которых показана возможность получения при действии колхицина *in vitro* различных типов изменений [159, 255, 467, 573]. Так, из каллусов тритикально-ячменных гибридов на средах с колхицином были регенерированы растения с комплексом изменений по хромосомным числам и морфологии [37]. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования у герани обработки колхицином каллусных культур в качестве самостоятельного методического приема, позволяющего повысить уровень изменчивости и создать новые генотипы для селекции.

#### **6.4 Изучение действия NaCl на каллусо- и морфогенез *in vitro* и разработка режимов клеточной селекции**

Одним из стрессовых факторов окружающей среды, который наносит существенный ущерб сельскому хозяйству, является засоление почв. В условиях интенсивного землепользования мелиорированные земли являются реальным резервом расширения посадок под герань. Однако для этого необходимы устойчивые сорта, для создания которых перспективно использование биотехнологических подходов, в частности, клеточной селекции, основанной на сходных механизмах устойчивости к стрессам, проявляющихся как на уровне целого растения, так и на уровне изолированных клеток [105, 191]. Для разработки методов клеточной селекции на устойчивость к абиотическим стрессовым факторам у эфиромасличной герани необходимо решить многие методологические вопросы, связанные с созданием адекватной селективной системы. Это касается выбора биотехнологического объекта, селективного фактора и длительности его действия, схемы отбора *in vitro*, регенерации из устойчивых линий и других проблем. Для моделирования солевого стресса в питательную среду часто вводят NaCl, который нередко используется и как ионный осмотик с целью получения засухоустойчивых форм [47, 49, 51, 117, 191, 213, 486], что также весьма перспективно и для

герани. Поэтому с целью разработки методов клеточной селекции на устойчивость к засолению проведено исследование особенностей действия NaCl на каллусо- и морфогенез у герани.

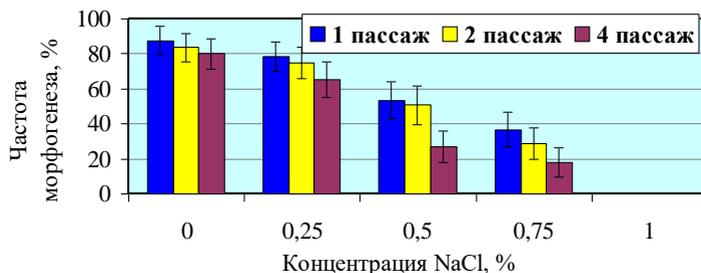
На первых этапах экспериментов проводили оценку действия различных концентраций NaCl на прирост массы каллуса за цикл выращивания. Для этого использовали каллусы 4-го пассажа, полученные из эксплантов черешка у сорта Розовая. Как видно из полученных данных, концентрация 0,25% NaCl оказывала селективное действие, вызывая снижение прироста каллуса (рис. 6.10). В течение четырех пассажей в опыте прирост каллуса на этой среде снижался с 80,6 до 27,6% от контроля. Концентрации NaCl выше 1,0% оказали летальное действие, приводя к некрозу каллуса. Использование для выделения устойчивых линий ступенчатого отбора (с увеличением при субкультивировании содержания соли от 0,25 до 0,75%) было неэффективным. У герани для получения устойчивых к засолению линий целесообразно использовать в качестве сублетальной концентрацию 0,75% NaCl. На такой питательной среде в течение двух пассажей наблюдался небольшой прирост, и выделялось до 26% каллусных линий, которые на селективной среде имели 10-20% прирост к контролю, а после снятия селективной нагрузки восстанавливали ростовой индекс.



**Рис. 6.10** Влияние концентрации NaCl в питательной среде и пассажа на прирост массы неморфогенного каллуса герани

Важной проблемой при разработке методов клеточной селекции является индукция морфогенеза и регенерация растений у отобранных на селективном фоне линий, так как резистентные линии могут снижать свою регенерационную способность [14, 47, 117, 253, 486]. У герани

отобранные солеустойчивые каллусные линии при переводе на регенерационную среду без стрессового фактора проявляли способность к морфогенезу и при этом образовывались единичные проростки. Как видно из представленных на рис. 6.11 данных, частота морфогенеза снижалась с увеличением концентрации стрессового фактора и пассажа. Однако даже при переносе линий со среды с добавлением 0,75% NaCl на среду для индукции морфогенеза частота морфогенеза в 1-4-м пассажах составила 36,7-18,2%. У отобранных при сублетальной концентрации каллусов индукция морфогенеза проходила медленнее, чем в контроле, а также наблюдалось образование аномальных побегов.

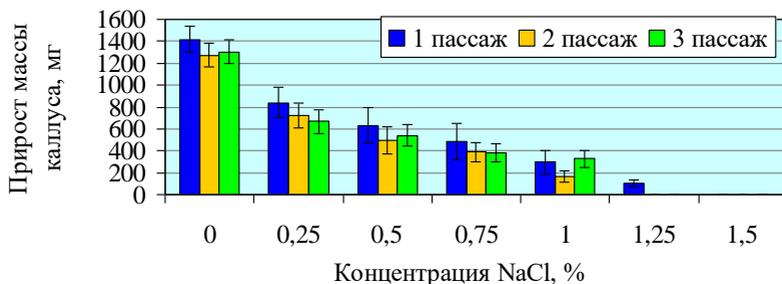


**Рис. 6.11 Влияние концентрации NaCl в питательной среде для каллусогенеза и пассажа на индукцию морфогенеза при переносе каллуса герани на регенерационную среду**

В литературе имеются достаточно противоречивые данные о необходимости проведения регенерации растений при селективной нагрузке. В одних исследованиях индукцию морфогенеза из отобранных устойчивых линий проводили на средах без селективного фактора [14, 48], в других же работах отмечали необходимость присутствия стрессового фактора в период регенерации растений [38, 47, 213].

С целью поиска оптимальной селективной системы исследовано действие NaCl при его добавлении в среду для индукции морфогенеза, на которой культивировали неморфогенные каллусы герани. Показано, что введение стрессового фактора в регенерационную среду более эффективно. В данной системе сублетальная концентрация соли была выше – 1,0% NaCl (рис. 6.12). Также отмечали лучшую пролиферацию каллусов (по сравнению с неморфогенным) – в течение трех пассажей прирост массы каллуса к контролю составил 20-25%. При этом удалось выделить 11,8% каллусных линий с ростовым индексом почти на уровне

контроля (8,2-9,8). Необходимо отметить, что у герани каллусные культуры проявили достаточно высокую чувствительность к засолению и выявленные для них сублетальные концентрации соли были ниже, чем у некоторых видов растений (1,5-3,0% NaCl) [49, 117, 124, 191].

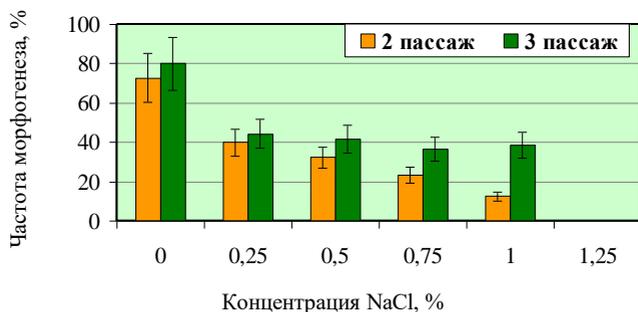


**Рис. 6.12 Влияние концентрации NaCl в регенерационной питательной среде и пассажа на прирост массы каллуса герани**

На питательной среде для регенерации с добавлением 1,0% NaCl в первом пассаже у каллусов формировались зеленые меристематические центры. Почки и побеги (с частотой 12,5%) появились только во втором пассаже (рис. 6.13). Индукция морфогенеза и регенерация побегов в третьем пассаже при сублетальной концентрации соли проходила с большей частотой (38,4%), что может быть связано с задержкой процесса морфогенеза. Следует отметить, что на среде с сублетальной концентрацией NaCl иногда появлялись нормальные проростки с антоциановой окраской побегов и листьев.

При переносе хорошо развитых проростков с корнями для адаптации в обычные условия выращивания выявили низкую частоту приживаемости полученных регенерантов. Развитие из устойчивых клеточных линий аномальных или стерильных регенерантов и их плохую приживаемость *in vivo* также отмечали у других видов растений [14, 47, 48, 117].

Сравнительный анализ устойчивости выделенных регенерантов по сравнению с исходным сортом проведен с использованием изолированных меристем. В табл. 6.3 представлены данные о развитии меристем *in vitro* на среде с 1% NaCl у регенерантов (№№ 414-1; 414-17), полученных из устойчивых каллусных линий на регенерационной среде с 1% NaCl, и сорта Розовая.



**Рис. 6.13** Влияние концентрации NaCl в регенерационной питательной среде и пассажа на индукцию морфогенеза в каллусе герани

**Таблица 6.3** Влияние NaCl в питательной среде на развитие меристем герани различного происхождения

Происхождение образца	Концентрация NaCl, %	Приживаемость меристем, %	Длина побега, мм	Кол-во листьев, шт.	Кол-во адвентивных побегов на эксплант, шт.
Сорт Розовая	0	100,0	20,7±3,2	3,8±0,2	3,9±0,4
	1,0	21,3*	4,6±0,3*	1,3±0,1*	0*
Регенерант № 414-1	0	100,0	14,3±1,1	2,6±0,3	2,8±0,6
	1,0	81,8	9,2±0,9*	1,7±0,2	1,9±0,5
Регенерант № 414-17	0	100,0	16,4±1,4	3,1±0,4	2,2±0,7
	1,0	92,3	11,7±1,2	2,3±0,3	2,0±0,7

\*Различия достоверны по сравнению с питательной средой без NaCl при  $p \leq 0,05$

Установлено, что у исходного сорта на среде с засолением все показатели снижались более чем в 4 раза по сравнению с контролем, а адвентивные побеги не формировались. Развитие изолированных меристем у полученных на среде с засолением регенерантов угнеталось в меньшей степени, и большинство изученных показателей достоверно не отличалось по сравнению с питательной средой без NaCl. Данные факты могут косвенно свидетельствовать о повышении солеустойчивости у полученных из каллусных линий растений. Таким образом, разработанные приемы отбора *in vitro* на солеустойчивость позволяют создавать ценный исходный материал для селекции эфиромасличной герани.

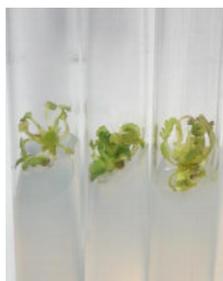
## 6.5 Оптимизация условий клонального микроразмножения герани эфиромасличной с использованием культуры меристем

Клональное микроразмножение *in vitro* является одним из этапов биотехнологической системы создания исходного селекционного материала у герани. С другой стороны, его использование может способствовать повышению эффективности и решению ряда проблем традиционной селекции [26, 44, 94, 155, 143, 219, 344]. В литературе имеются данные об использовании для размножения у различных видов *Pelargonium* меристем [293, 515], сегментов стебля с узлом [162, 344, 570, 576], прямой регенерации из разных эксплантов [372, 488], а также непрямого морфогенеза из каллусов [181, 535]. Выбор метода микроразмножения, прежде всего, зависит от генетической стабильности получаемых *in vitro* растений, а также от морфогенетических особенностей культивируемых тканей и органов.

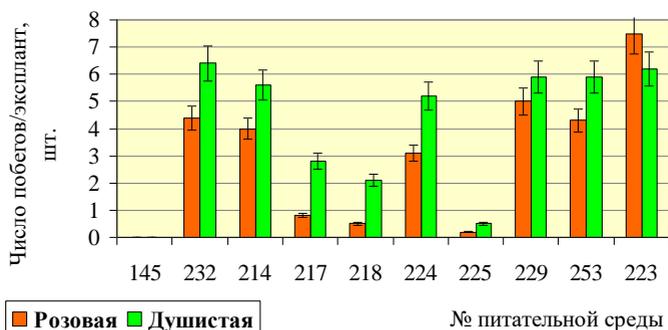
В результате наших исследований для разных сортов герани разработаны методы прямого морфогенеза из эксплантов стебля, черешка, листа и регенерации из каллусных культур. Как уже отмечалось, при образовании адвентивных побегов на эксплантах часто одновременно формировался каллус, в котором наблюдали начальные этапы индукции морфогенеза. В результате этих процессов могли формироваться побеги, часть которых возникала в результате прямого морфогенеза, а часть – из каллуса. Значительный уровень соматоклональной изменчивости, выявленный в ряде зарубежных работ у герани [372, 535, 551], а также наши данные о возможности появления измененных форм у изученных сортов [54], свидетельствует о нецелесообразности использования данных подходов для размножения, когда необходимо сохранение генетической стабильности. Наиболее перспективным методом для микроразмножения может быть индукция развития пазушных или апикальных меристем, поэтому основной объем исследований в этом направлении связан с оптимизацией этапов размножения в культуре меристем *in vitro*.

Начало развития меристем герани отмечали на 7-10-е сутки после их введения в культуру. При этом увеличивались размеры эксплантов, появлялись сформированные листья и развивались побеги длиной до 16-20 мм (рис. 6.14). Изредка у основания побега формировался каллус. На первом этапе микроразмножения, наряду с ростом основного побега, отмечали образование до 5-8 дополнительных почек и побегов.

**Рис. 6.14 Развитие меристем герани сорта Розовая при введении в культуру *in vitro***



При культивировании меристем *in vitro* важным фактором является гормональный состав питательной среды. Часть данных, полученных при анализе различных модификаций среды МС, представлена на рис. 6.15.



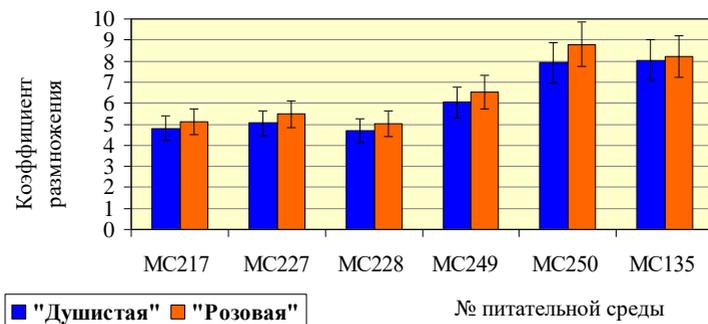
**Рис. 6.15 Влияние гормонального состава питательной среды и сорта на число побегов на эксплант в культуре меристем герани**

Гормональные добавки в среде МС (мг/л): МС145 – без гормонов; МС232 – БАП (0,5); МС214 – БАП (1,0); МС217– Кин (0,5); МС218 – Кин (1,0); МС 224 – БАП (1,0) +ИУК (0,1); МС 225 – БАП (1,0)+НУК (0,1); МС 229 – БАП (1,0) +ГК<sub>3</sub> (1,0); МС 253 – БАП (0,5)+ ТИБК (0,05); МС 223 – БАП (1,0) + ТИБК (0,05)

Установлено, что на безгормональной среде развития меристем не происходило. Добавление в среду одного из цитокининов благоприятно влияло на развитие меристем, причем БАП вызывал формирование значительно большего числа дополнительных побегов и лучшее развитие меристем по сравнению с Кин (среды МС 214, 217, 218, 232). Повышение содержания БАП до 2,0 мг/л способствовало увеличению числа побегов. Однако до 80-90% побегов были оводненными, поэтому такое повышение концентрации этого регулятора роста нецелесообразно. Введение в питательную среду, содержащую БАП, ауксина ИУК или НУК (МС 224,

МС 225) приводило к значительному снижению числа побегов и повышению частоты каллусогенеза до 57,1%. На первом этапе микроразмножения среда МС223 (содержащая 1,0 мг/л БАП и 0,05 мг/л ТИБК) обеспечивала лучшее развитие меристем и максимальное число побегов (6,2-7,5 шт. на эксплант, в зависимости от сорта).

Полученные на этапе введения конгломераты побегов в дальнейшем разделяли на одиночные микропобеги с 2-3 листьями и пересаживали на модификации среды МС с низкой концентрацией гормонов, солей, сахарозы и других компонентов (рис. 6.16). На 2-м этапе для размножения у герани использовали индукцию пазушных и адвентивных побегов. Наибольший коэффициент размножения и лучшее развитие побегов отмечены на среде  $\frac{1}{2}$  МС с добавлением 0,1 мг/л БАП, 1% сахарозы и исключением витаминов и инозита (МС 250).



**Рис. 6.16 Влияние состава питательной среды и сорта на коэффициент размножения на 2-м этапе микроразмножения герани**

Гормональные добавки в среде  $\frac{1}{2}$  МС (мг/л): МС217 – БАП (0,05); МС228 – БАП (0,5)+ГК<sub>3</sub> (0,5); МС227 – БАП (0,5); МС249 – БАП (0,5), без витаминов; МС135 – БАП (0,05)+ ИУК (0,05); МС250 – БАП (0,1), без витаминов, инозита

Второй этап микроразмножения может включать несколько субкультивирований на этой среде, позволяющих увеличить количество побегов. В среднем за 4 года исследований коэффициент размножения за одно субкультивирование у сортов Розовая, Душистая и Крунк составил соответственно  $8,1 \pm 0,2$ ;  $7,3 \pm 0,2$ ;  $6,9 \pm 0,2$ . При этом у сортов не выявлено достоверного изменения коэффициента размножения.

В работах по микроразмножению герани, наряду с важной ролью состава питательной среды, авторы отмечали существенное влияние

генотипа [293, 344, 369, 570], типа экспланта [162], а также фотопериода и температуры выращивания донорных растений, количества пассажиров [293]. На примере исследований по культуре меристем и узловых сегментов стебля у эфиромасличной герани видно разнообразие питательных сред, рекомендуемых для микроразмножения. Так, у различных сортов *P. graveolens* для пролиферации побегов R.P. Tembe и M.A. Deodhar использовали среду Нич, Нич с добавлением БАП [570], A.K. Kumar и D. Patnaik вводили в состав среды МС повышенные концентрации инозита (200-600 мг/л), а также НУК, Кин и БАП [162], а R. Gupta с соавторами добавляли НУК, Ад и БАП [369]. Вместе с тем, в исследованиях Tilahun Rabuma [576] показано, что оптимальной для микроразмножения *P. graveolens* была безгормональная среда МС. Такие различия состава сред, прежде всего, обусловлены использованием в этих работах разных генотипов. Существенное влияние видовых и сортовых особенностей на размножение герани отмечали во многих работах [293, 369, 570].

Установлено, что у герани необходим традиционный третий этап укоренения *in vitro*, так как полученные в результате микроразмножения побеги обычно не имели корней, поэтому их необходимо переносить на среды с ауксинами (табл. 6.4). Как видно из представленных данных, из трех анализируемых ауксинов наиболее эффективной для индукции ризогенеза оказалась НУК. При оптимальной концентрации этого регулятора роста (0,1 мг/л) наблюдали максимальную частоту укоренения (97,2%) и наиболее высокие значения длины и числа корней. Полученные результаты согласуются с данными некоторых авторов, использовавшими 0,1-1,0 мг/л НУК для укоренения *P. zonale*, *P. pelatum*, *P. roseum* [488]. Однако в других работах для этих целей применяли ИМК [570], только ИУК или совместно с Кин [293], а также безгормональную среду [162, 576].

Укорененные проростки герани для дальнейшего развития переносили из колб в обычные условия выращивания. Подобран оптимальный режим акклиматизации *in vivo*, включающий выращивание меристемных растений первые 2-3 недели в смеси торфа и перлита (1:1) при высокой влажности (90-100%) и освещенности 2 клк. Данные условия обеспечивали достаточно высокую приживаемость, до 70-80% в зависимости от генотипа. На протяжении 2-3 лет наблюдений полученные меристемные растения герани по морфологии не отличались от исходных сортов. Сравнительный анализ содержания эфирного масла и некоторых

его компонентов (цитронеллола, гераниола, ментона) у растений, традиционно размноженных черенками, и полученных в культуре меристем *in vitro*, также не выявил достоверных различий по этим параметрам.

**Таблица 6.4 Влияние гормонального состава питательной среды МС на укоренение микропобегов герани сорта Розовая**

Концентрация ауксинов в среде МС, мг/л	Частота укоренения, %	Кол-во корней на 1 побег, шт.	Длина корня, мм
б/г	43,2±3,4	5,7±0,5	17,9±1,1
ИУК(0,5)	68,6±5,9	10,5±0,9	18,5±1,0
ИМК(0,5)	61,5±6,3	5,9±0,4	17,2±0,9
НУК(0,05)+ИУК(0,05)	88,6±5,2	8,1±0,5	29,0±1,4
НУК(0,1)	97,2±3,1	21,3±1,1	34,2±1,7
НУК (0,5)	90,6±3,9	9,6±0,6	20,1±1,1
НУК (1,0)	81,3±5,2	9,1±0,7	17,5±1,0

Большинство исследователей при анализе растений герани, полученных при микроразмножении с использованием культуры меристем или сегментов стебля с узлом, отмечали отсутствие каких-либо отклонений от исходных форм [162, 570]. Однако А.С. Cassells и G. Minas [293] при микроразмножении 27 сортов герани в культуре меристем получили 13% растений с аномальными листьями и побегами, из которых только 80% через год возвращались к нормальному фенотипу. Имеются данные о том, что даже при традиционном вегетативном размножении у эфиромасличной герани в потомстве могут появляться формы, измененные по морфологии, содержанию и составу эфирного масла [417]. Это указывает на необходимость контроля стабильности признаков при разных способах размножения.

На основе проведенных исследований разработана методика микроразмножения в культуре меристем эфиромасличной герани, которая может использоваться для быстрого размножения регенерантов, ценного селекционного материала и новых сортов, что позволит существенно повысить эффективность процесса размножения. Известно, что при традиционном размножении черенкованием обычно за год получают не более 15-20 саженцев с куста герани [194]. При микроразмножении *in vitro* за год из одной меристемы можно получить не менее 80-100 тысяч адаптированных мериклонов. При биотехнологическом способе получения новых генотипов целесообразно размножать полученные из

каллусов проростки, начиная сразу со второго этапа, собственно микроразмножения.

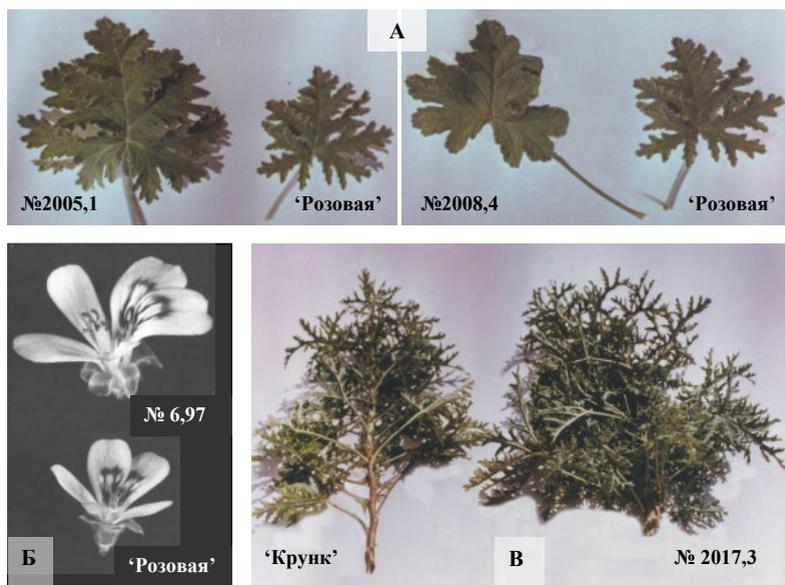
### **6.6 Изучение полученных из каллусных культур регенерантов по морфологии, числу хромосом и хозяйственно ценным признакам**

При создании различных клеточных технологий очень важен анализ полученных в каллусной культуре регенерантов, так как при единообразии этих растений можно использовать непрямую регенерацию *in vitro* для клонального микроразмножения [26, 138, 219]. При наличии же соматоклональной вариабельности можно создавать новый исходный материал для селекции [47, 191, 429, 463]. Одними из первых сообщений о получении измененных форм растений в культуре каллусных тканей были статьи R.M. Skirvin и J. Janick, [551]. При анализе полученных из каллусов герани растений они выявили их значительную изменчивость по морфологии, составу эфирного масла, а также показали наличие карликовых форм и полиплоидов. Количество измененных растений зависело от вида – у *P. graveolens* всего 10% регенерантов имели измененную морфологию листа, тогда как у *P. denticulatum* x *P. domesticum* и *P. capitatum* соответственно 57 и 66% [551]. Из регенерантов *P. graveolens* этими авторами получен полиплоидный сорт Velvet Rose с крупными цветками и листьями. В более поздних работах другие исследователи у регенерантов этого вида герани также выявили соматоклональные изменения по урожайности, высоте и форме растений, размеру и форме листа, содержанию и компонентному составу эфирного масла [368, 417, 516, 535]. Среди соматоклонов нескольких видов *Pelargonium* обнаружены формы, устойчивые к бактериальному ожогу герани [322]. В то же время в исследованиях A. Hassanein и N. Dorion с помощью цитометрического анализа установлено, что все растения, полученные при прямой регенерации из листьев у *P. graveolens* и *P. capitatum* были схожи с материнским растением, тогда как у *P. hortorum* выявлено 71% тетраплоидов [372]. При анализе плоидности регенерантов из листовых эксплантов *P. rapaceum* показана их генетическая стабильность и соответствие исходной форме [562].

В наших исследованиях полученные из каллусов растения вначале выращивали в условиях теплицы и проводили цитологический анализ для подсчета числа хромосом, а также предварительный анализ морфологии растений и содержания эфирного масла. Затем вегетативно размноженные регенеранты для изучения по морфологическим и хозяйственно ценным

признакам передавали в зоны основного выращивания эфиромасличной герани в СНГ – Таджикистан и Армению. При анализе учитывали только те морфологические изменения, которые проявлялись в вегетативном потомстве в течение 2-3 лет изучения в полевых условиях.

Основная часть регенерантов не отличалась по морфологии от исходных сортов [54]. Вместе с тем было выявлено значительное число форм, измененных по морфологическим и некоторым другим признакам. Наличие морфологически измененных регенерантов отмечено у всех изученных сортов – Розовой, Крунк, Регар, Душистой. Большая часть исследований проведена на примере регенерантов основного возделываемого сорта Розовая. Изменения у регенерантов затрагивали такие признаки, как форма и размеры куста, толщина стебля, окраска, размер и форма листовой пластинки, длина междоузлий, размеры цветка (рис. 6.17, табл. 6.5).



**Рис. 6. 17** Изменчивость регенерантов герани по сравнению с исходными сортами (Розовая и Крунк) по морфологии – изменение листовой пластинки (А), цветка (Б), длины междоузлий (В)

**Таблица 6.5 Влияние сорта, экспланта и обработки колхицином на образование морфологически измененных форм герани из каллуса**

Происхождение регенерантов			Обработка колхицином	Частота измененных форм, %	Измененные признаки
сорт	эксплант	пассаж			
Розовая	лист	1	-	20,0	высота куста, форма листовой пластинки
	стебель	1	-	20,0	толщина стебля, размер и форма листовой пластинки, фертильность, размер цветка
		3	-	33,3	форма куста, толщина стебля, окраска и форма листовой пластинки, фертильность, размер цветка
		3	10,0 мг/л – 6 сут	50,0	толщина стебля, форма листовой пластинки, фертильность, размер цветка
	черешок	1	-	9,5	форма листовой пластинки, фертильность, размер цветка
		1	10,0 мг/л – 6 сут	53,8	высота и размер куста, окраска, размер и форма листовой пластинки, фертильность, размер цветка
Крунк	стебель	3	-	20,0	размер и форма листовой пластинки
		3	10,0 мг/л – 6 сут	42,8	длина междоузлий, окраска и форма листовой пластинки, размер цветка
		8	-	56,2	длина междоузлий, размер и форма куста, окраска, размер и форма листовой пластинки
	черешок	3	-	16,7	толщина стебля, размер и форма куста
Регар	стебель	3	-	30,0	размер и форма листовой пластинки, размер куста
	черешок	3	-	14,3	длина междоузлий, окраска листовой пластинки

Следует отметить появление среди регенерантов сорта Розовая (для которого характерна мужская стерильность и редуцированные пыльники) растений-регенерантов с полностью или частично восстановленной фертильностью мужского гаметофита. У этих форм цветки и тычиночные нити были крупнее, чем у 'Розовой', и фертильность пыльцы достигала 70-85%. При искусственном самоопылении у таких регенерантов завязались нормальные семена. Получение фертильных форм важно для селекции, так как из-за стерильности семенное размножение этого сорта невозможно, а кроме того, его нельзя использовать в качестве отцовской

формы при гибридизации [114]. Для *P. graveolens* сообщалось о получении фертильного полиплоидного сорта при анализе регенерантов, полученных из каллусных культур [551].

Установлено, что частота встречаемости морфологически измененных форм зависела от длительности пассирования каллуса, типа экспланта и обработки колхицином (см. табл. 6.5). Наибольшая изменчивость характерна для регенерантов, полученных из каллусов поздних пассажей. Так, среди растений, полученных из каллуса 3-го пассажа сорта Крунк, выявлено 20% измененных форм, тогда как из каллуса 8-го пассажа – 56,2%. Растения, полученные из каллусов, культивируемых более 9-12 пассажей, обычно отличались меньшим размером куста, слабой приживаемостью и угнетенным ростом. Поэтому регенерация из таких культур соматклонов, по-видимому, нецелесообразна из-за низкой вероятности появления ценных для селекции образцов. Для некоторых видов растений также показано повышение варибельности регенерантов при использовании аналогичных факторов [37, 47, 49, 112, 191, 192, 224, 345].

Значительное повышение морфологической изменчивости наблюдали при мутагенной обработке – введение в питательную среду колхицина у обоих сортов при использовании эксплантов черешка способствовало почти двукратному увеличению числа измененных форм, а при использовании у сорта Розовая сегментов черешка произошло увеличение изменчивости в 5 раз (см. табл. 6.5). При сравнении разных типов эксплантов отмечена более низкая частота измененных форм, полученных из каллусов, индуцированных из черешка. Так, изменчивость растений, регенерировавших у сорта Розовая из черешкового каллуса, была почти в два раза ниже, по сравнению с регенерантами из каллуса стеблевого и листового происхождения. Степень изменчивости регенерантов у трех сортов была довольно близка, хотя нужно отметить, что частота измененных регенерантов из стеблевого каллуса 3-го пассажа у ‘Крунка’ в 1,5 раза ниже, чем у ‘Розовой’ и ‘Регара’.

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что спектр измененных признаков у регенерантов разного происхождения (в зависимости от пассажа, экспланта, мутагенеза) у всех сортов был примерно одинаков. В частности, фертильные формы получены из стеблевого и черешкового каллуса, а также как после обработки колхицином, так и без нее. То есть направленно получать какие-либо конкретные морфологические изменения при варьировании изученных

факторов у герани, по-видимому, пока невозможно. Следует лишь отметить, что увеличение длительности культивирования каллуса способствовало возникновению определенных изменений, в частности, не желательного угнетения роста.

При анализе соматоклональной изменчивости у эфиромасличной герани обращает внимание тот факт, что у одного регенеранта могли быть измененными сразу несколько признаков – например, цвет и форма листовой пластинки (регенерант №874,9); размер листа и фертильность мужского гаметофита (регенерант №2094,3). У регенеранта № 2008,4 выявлено увеличение размеров листа, стебля, цветка, появление фертильных пыльников и увеличение числа хромосом.

Более четкую картину происходящих у соматоклонов изменений дает анализ хромосомных чисел регенерантов, индуцированных в каллусных культурах сортов Розовая, Крунк и Душистая (табл. 6.6). Как видно из представленных данных, растения-регенеранты герани характеризовались значительной вариабельностью по числу хромосом. В культуре *in vitro* получены диплоидные регенеранты, имеющие такое же число хромосом, что и исходные сорта ( $2n=56$ ). Вместе с тем, выявлены регенеранты с анеуплоидным числом хромосом. Число хромосом у анеуплоидов варьировало от 46 до 82 (рис. 6.18).

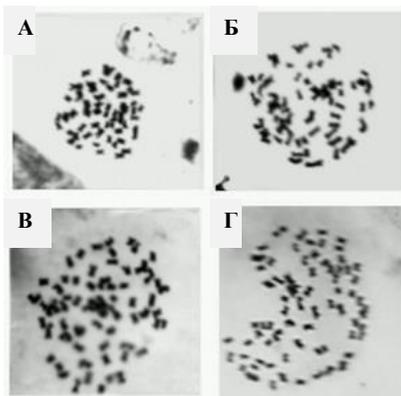
**Таблица 6.6 Изменчивость числа хромосом у регенерантов, полученных в каллусной культуре герани**

Сорт	Эксплант	Обработка	Количество проанализированных растений, шт.			Число хромосом у анеуплоидов, шт.
			всего	диплоидов	анеуплоидов	
Розовая	стебель	-	11	9	2	72, 72, 72
	черешок	-	9	4	5	52, 62, 66, 68, 72
	стебель	колхицин 10,0 мг/л - 6 сут	4	1	3	72, 72, 72
	черешок		17	7	10	52, 52, 62, 64, 66, 68, 72, 72, 72, 82
Душистая	стебель	-	23	19	4	62, 62, 64, 72
Крунк	стебель	-	5	1	4	48, 64, 72, 81

**Рис. 6.18 Метафазные пластинки герани сорта Розовая и полученных из каллусов регенерантов.**

А – сорт Розовая ( $2n=56$ ); Б – регенерант № 2194,8 ( $2n=64$ ); В – регенерант № 883,1 ( $2n=68$ ); Г – регенерант № 2012,3 ( $2n=72$ ).

Ув. 2200.



Из каллусных культур сортов Аист и Регар также были получены регенеранты, среди которых выявлены формы с геномными отклонениями. Таким образом, растения с измененным числом хромосом получены из каллусных культур у всех изученных сортов и типов эксплантов. В общей сложности в наших исследованиях среди регенерантов разного происхождения, полученных из каллусов 1-3-го пассажей у сортов эфиромасличной герани ( $2n=56$ ), выявлено 61% диплоидных форм и 39% анеуплоидов, из которых  $2n=7x+16=72$  (25,6%),  $2n=7x+12=68$  (10,2%),  $2n=7x+8=64$  (5,1%),  $2n=7x+6=62$  (12,8%).

При анализе данных об изменчивости числа хромосом у регенерантов было бы не корректным делать окончательное заключение о влиянии генотипа, экспланта и мутагенной обработки, так как соматоклональная изменчивость является следствием не только изменения числа хромосом, но и хромосомных и генных перестроек [112, 191, 192, 226]. Вместе с тем полученные данные показывают, что введение колхицина в питательную среду способствовало появлению большого числа анеуплоидных регенерантов, что особенно проявилось при использовании эксплантов стебля. Получены формы с увеличенным числом хромосом:  $2n=64$  (№2194-8),  $2n=68$  (№2061-1),  $2n=72$  (№№ 2061-2; 2012-3) и другие. Большинство этих регенерантов отличались от исходного сорта Розовая и по морфологии.

Вегетативное потомство регенерантов герани, полученных из каллусных культур 1-3-го пассажа, анализировали по ряду хозяйственно полезных признаков при выращивании в полевых условиях на Таджикской опытной станции (табл. 6.7). Установлена их значительная вариабельность

по многим изученным признакам по сравнению с исходным сортом Розовая [54]. Особенно значительны пределы варьирования у регенерантов по таким признакам как высота растения, масса куста, урожайность и сбор эфирного масла. При этом наблюдалось изменение признаков как в сторону их ухудшения, так и в сторону повышения значений. Количество регенерантов, превосходящих исходный сорт, зависело от признака. Например, по высоте растений и массовой доле листа 61-67% регенерантов превысили 'Розовую'. По МДЭМ более половины регенерантов были лучше исходного сорта, а по остальным признакам (урожайности и сбору эфирного масла) превышение составило всего около 13%.

**Таблица 6.7 Варьирование некоторых хозяйственно ценных признаков у регенерантов, полученных из каллусов герани сорта Розовая\***

Признак	Исходный сорт Розовая	Регенеранты Lim	Количество регенерантов, превысивших сорт Розовая, %
Высота растения, см	43,9	19,7 – 59,2	61,6
Массовая доля листа, %	57,8	47,3 – 67,2	67,5
Масса одного куста, кг	2,62	0,10 – 3,83	11,4
Урожайность, т/га	72,7	2,8 – 106,5	12,8
МДЭМ на общую массу, %	0,108	0,077- 0,150	56,8
Сбор масла, кг/га	78,5	12,0 – 98,1	13,5
Массовая доля в эфирном масле (%):			
- цитронеллола	53,2	5,55 – 61,41	20,9
- гераниола	6,89	3,66 – 28,25	77,9
- ментона	6,40	1,60 – 76,11	56,9
- нерола	1,23	0,0 – 5,79	18,5

\* (Таджикская опытная станция, 1989 г.)

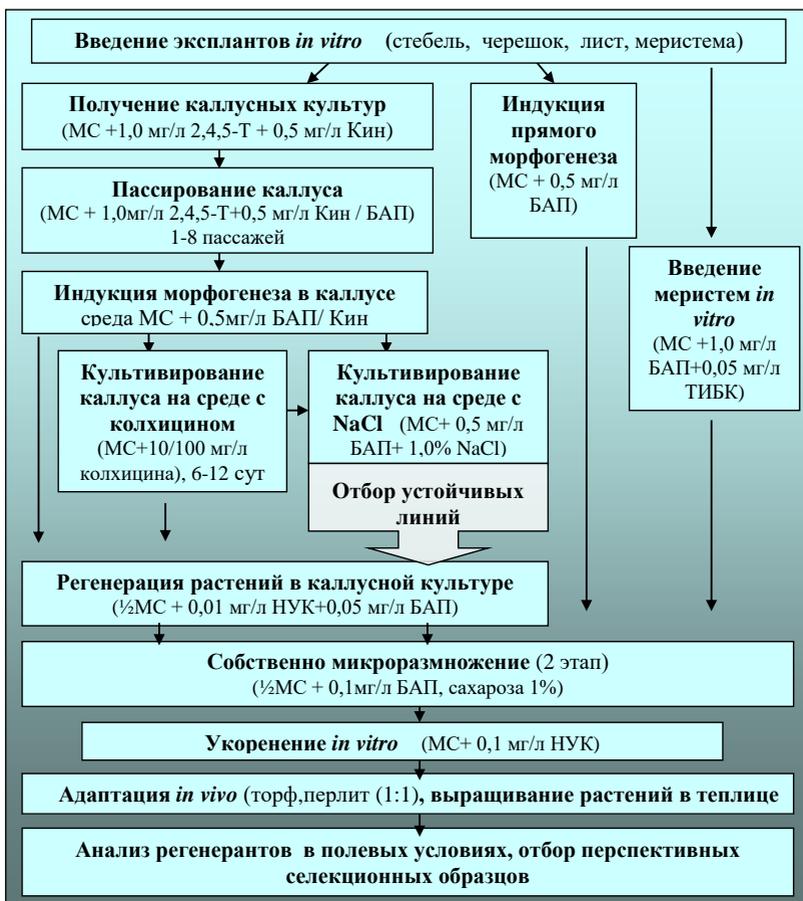
Выявлена также значительная изменчивость регенерантов по составу эфирного масла, в частности, по содержанию его основных компонентов - цитронеллола, гераниола, ментона и нерола (см. табл. 6.7). Выделено несколько растений с измененным хемотипом, у которых основным компонентом эфирного масла был не цитронеллол (как у сорта), а гераниол или ментон. Это свидетельствует о возможности

использования соматклонов для селекции на измененный компонентный состав эфирного масла.

Необходимо отметить, что среди лучших отобранных по хозяйственно полезным признакам регенерантов герани были растения, полученные в основном из каллусов 1-3-го пассажей, причем с использованием разных типов эксплантов (черешка, стебля, листа). Из культур более поздних пассажей преимущественно регенерировали морфологически измененные формы, а, начиная с 8-го пассажа, появлялись нежизнеспособные и карликовые растения.

Наличие среди регенерантов форм, превысивших исходный сорт по некоторым хозяйственно ценным признакам, позволило отобрать ряд перспективных для селекции образцов. При анализе семи регенерантов в питомнике предварительного сортоиспытания было установлено, что пять образцов на 48-76% достоверно превысили сорт Розовая по урожайности зеленой массы и сбору эфирного масла. Так, у регенеранта №757,4 (полученного из стеблевого каллуса) основной показатель, сбор эфирного масла, составил 40,50 кг/га, тогда как у исходного сорта – 23,15 кг/га. На основании полевых трехлетних исследований эти регенеранты герани рекомендованы для дальнейшей передачи в конкурсное сортоиспытание.

В результате экспериментальных исследований у герани подобраны условия для регенерации растений из каллусов и микроразмножения *in vitro*. Показана возможность получения соматклонов и выявлены некоторые факторы, влияющие на их особенности. Разработаны режимы получения новых форм на основе мутагенеза и клеточной селекции на устойчивость к NaCl. Эти результаты послужили основой для разработки биотехнологической системы создания новых форм у герани эфиромасличной и их ускоренного размножения, которая представлена на рис. 6.19. Использование предложенных приемов клеточной инженерии позволило создать разнообразный исходный материал для селекции этой эфиромасличной культуры и выделить перспективные формы с хозяйственно ценными признаками.



**Рис. 6.19** Схема биотехнологической системы создания и размножения новых форм герани эфиромасличной

## ГЛАВА 7

### ФЕНХЕЛЬ ОБЫКНОВЕННЫЙ (*FOENICULUM VULGARE* MILL.)

Фенхель обыкновенный (*Foeniculum vulgare* Mill.) относится к семейству Сельдереиных (Apiaceae) и возделывается в основном для получения эфирного масла, основными компонентами которого являются анетол (60-80%), фенхон (2-22%) и метилхавекол (3-15%) [151, 173, 164]. Анетол используется в фармацевтической, пищевой и мыловаренной промышленности, а также служит сырьем для синтеза применяемого в парфюмерии обенина. В медицине эфирное масло фенхеля применяется как болеутоляющее, антисептическое, согревающее, смягчительное средство при заболеваниях желудочно-кишечного тракта, бронхиальной астме, коклюше и других [390, 434]. Плоды содержат 16-20% жирного масла, в состав которого входят олеиновая, линоленовая, петроселиновая, стеариновая и пальмитиновая кислоты, используемое в лакокрасочном производстве и как заменитель масла какао. Фенхель является также пряным, пищевым, декоративным и медоносным растением.

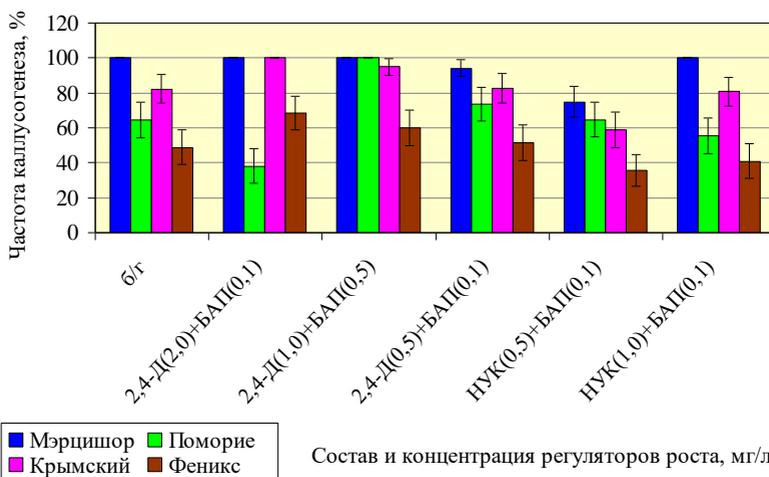
В промышленной культуре обычно используют *F. vulgare* – многолетнее травянистое растение высотой 1-2 м. Стебель у него однолетний, полый, ветвистый. Листья – очередные, многократно перисторассеченные, при этом нижние – крупные, черешковые, а верхние – более мелкие, с охватывающими стебель влагалищами. Соцветие – сложный зонтик, располагается на верхушке стебля и боковых ветвях, состоит из 10-25 простых зонтиков, в каждом из которых 10-25 мелких светло-желтых цветков. Плод состоит из двух семян, на внешней стороне которых между ребрышками размещено четыре, а на внутренней стороне – два эфиромасличных канальца. Фенхель – достаточно теплолюбивое растение, его переходящие на 2-3 год плантации хорошо зимуют только в южных районах. Он плохо переносит продолжительную засуху, особенно в период цветения и образования семян [194].

В селекционной работе у этого растения применяется в основном индивидуальный отбор [183], или гибридизация в пределах одного вида, поэтому процесс создания новых сортов довольно длительный и недостаточно эффективный. Одним из перспективных подходов в селекции может быть создание исходного материала с использованием клеточных технологий, что было весьма эффективно у многих

сельскохозяйственных растений [26, 94, 134]. В литературе имеются данные об исследовании у фенхеля процессов каллусогенеза и соматического эмбриогенеза, культивировании изолированных зародышей [170, 238, 378, 379, 458, 572], а также возможности биосинтеза эфирного масла в клеточных культурах [378]. В ряде работ отмечено влияние генотипа на морфогенез в каллусных тканях [251, 572] или на размножение *in vitro* [238]. Имеются сведения о влиянии возраста проростков, из которых выделяли экспланты, на индукцию каллусо- и морфогенеза у фенхеля [206]. Некоторые исследователи показали, что в культуре тканей возможно получение генетически стабильных растений [273, 458], хотя есть данные о различии регенерантов фенхеля по ряду признаков [378].

### 7.1 Оптимизация условий каллусогенеза и цитофизиологическая характеристика популяции каллусных клеток в цикле выращивания

В исследованиях процессов каллусо- и морфогенеза *in vitro* использованы сорта Мэрцишор и Оксамит Крыма, включенные в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию в РФ, оригинатором которых является ФГБУН «НИИСХ Крыма» [39, 164 ], а также сорта Поморие, Крымский, Феникс, образец К34 (Азербайджан) и гибрид К34 × ‘Мэрцишор’.

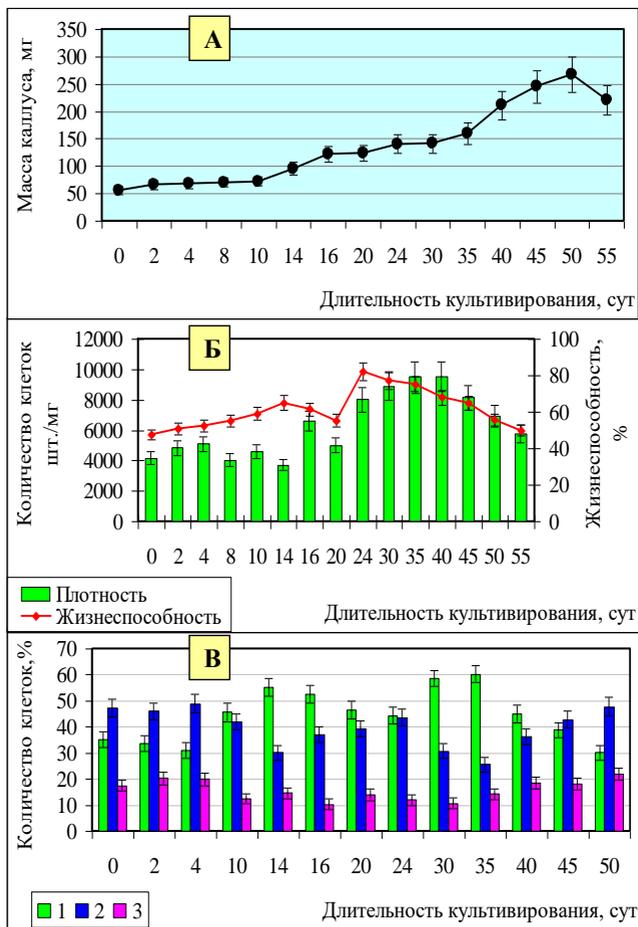


**Рис. 7.1** Влияние гормонального состава питательной среды и сорта на частоту индукции каллусогенеза из стеблевых эксплантов фенхеля

В ранее проведенных исследованиях по фенхелю [22] показано, что из изученных вегетативных органов (стебель, лист, черешок) наиболее подходящим типом экспланта для индукции образования каллуса являлись сегменты стебля. При анализе культивирования сегментов стебля показана высокая каллусообразующая способность питательных сред, содержащих 2,4-Д и БАП, на которых у сортов Мэрцишор, Поморие и Крымский частота каллусогенеза достигала 92-100% (рис. 7.1). Варианты среды МС с НУК и БАП и даже безгормональная среда были также эффективны, особенно для сорта Мэрцишор. Наряду с этим отмечены сортовые различия по способности к каллусогенезу – на большинстве питательных сред максимальное количество эксплантов с каллусом было у сорта Мэрцишор (до 100%), а минимальное – у сорта Феникс (до 68%). Для активного каллусообразования у изученных сортов необходимо использовать среду МС с добавлением 1,0 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л БАП.

Изучение цитофизиологических параметров популяции культивируемых каллусных клеток – важный этап разработки клеточных технологий, поскольку позволяет не только установить механизмы каллусогенеза, но и уточнить методические вопросы культивирования, в частности, выявить оптимальную длительность цикла выращивания. При исследовании в неморфогенном каллусе стеблевого происхождения сорта Мэрцишор 6-го пассажа определяли массу сырого каллуса, плотность, жизнеспособность и содержание разных типов клеток согласно общепринятым методикам [59, 97]. Как видно из представленных на рис. 7.2 данных, за цикл выращивания биомасса каллуса увеличилась незначительно и ростовой индекс составил всего 3,8. Отмечен достаточно продолжительный лаг-период, который длился почти 2 недели, в течение которых не наблюдали изменений изучаемых показателей. После этого каллусные культуры вступали в фазу экспоненциального роста, что сопровождалось усилением митотической активности, увеличением числа меристематических клеток и плотности каллуса.

Экспоненциальная и линейная фазы у фенхеля довольно продолжительны и прирост массы проходил очень медленно – не более 10 мг в сутки. В этот период отмечали повышение жизнеспособности популяции (до 82%) за счет деления и образования новых клеток. Переход популяции в фазу замедления роста на 40-е сут сопровождался увеличением количества клеток паренхимного типа, что связано с ростом клеток за счет растяжения, что и обеспечивало в этот период прирост биомассы.



**Рис. 7.2** Динамика изменения массы каллуса (А), плотности и жизнеспособности клеточной популяции (Б) и соотношения различных типов клеток (В) в цикле выращивания каллуса фенхеля сорта Мэрсшор. 1 – клетки меристематического типа, 2 – паренхимные округлые, 3 – паренхимные удлинённые клетки

Стационарная фаза наступала на 45-50-е сут культивирования. В этот период при достоверно не изменяющихся значениях массы происходило снижение жизнеспособности каллуса и числа меристематических клеток. В этой фазе наблюдали большое число (до

22%) удлиненных гигантских клеток. Такое позднее наступление стационарной фазы определяет продолжительность цикла выращивания, который у фенхеля должен составлять не менее 50 сут. Отдельные особенности фаз ростового цикла у фенхеля (в частности, большая длительность лаг-периода, позднее вступление в фазу стационарного роста) сравнимы с некоторыми видами растений. Например, у раувольфии змеиной и серпухи венценосной лаг-фаза также была продолжительной, а стационарная фаза наступала только после 60-70 сут культивирования [98, 112].

## **7.2 Влияние различных факторов на индукцию соматического эмбриогенеза в каллусных культурах**

Важнейшим этапом биотехнологических исследований является оптимизация условий индукции морфогенеза и регенерации растений. В более ранней работе по фенхелю [22], для непрямой индукции морфогенеза в качестве эксплантов использовали стебли, которые культивировали на средах с НУК и Кин. В нашем исследовании проанализирован более широкий спектр эксплантов и питательных сред, а также уделено внимание влиянию генотипических особенностей донорных растений на регенерационные процессы. Для стимуляции морфогенеза каллусные ткани, полученные из эксплантов стебля, зародыша и гипокотила проростков, с каллусогенной среды переносили на среды различного состава (табл. 7.1).

К концу второй недели культивирования на некоторых питательных средах на поверхности каллуса наблюдали формирование соматических эмбриоидов, из которых через 4-5 недель происходило развитие проростков (рис. 7.3). В наших экспериментах индукция морфогенеза у фенхеля проходила по типу соматического эмбриогенеза. В литературе для этого вида в основном отмечена индукция соматического эмбриогенеза в каллусной или суспензионной культуре [378, 379, 572]. При этом соматические зародыши в основном формировались на питательных средах с добавлением с 2,4-Д [379, 458, 572]. Наряду с этим М. Anzidei с соавторами описали регенерацию растений из каллусов *F. vulgare* как путем органогенеза, так и соматического эмбриогенеза. Причем образование побегов происходило на средах с НУК и Кин, а зародышей – при введении в среду одного 2,4-Д или в сочетании с Кин [251].

**Таблица 7.1 Влияние гормонального состава питательной среды и типа экспланта на частоту морфогенеза (%) в каллусе первого пассажа фенхеля сорта Мэрцишор**

Содержание регуляторов роста в среде МС, мг/л	Тип экспланта		
	стебель	зародыш	гипокотиль
Без гормонов	7,5±2,2	14,7±2,9	5,8±2,0
НУК(0,5)+Кин(0,5)	20,7±3,8	32,4±4,0	0
НУК(1,0)+Кин(0,5)	10,5±2,8	-	-
НУК(0,5)+Кин(1,0)	2,3±0,9	-	5,6±1,9
НУК(1,0)+БАП(0,5)	19,7±3,9	34,5±4,6	29,9±4,5
НУК(0,5)+БАП(1,0)	14,7±3,7	27,3±4,2	40,0±4,8
2,4-Д(1,0)+БАП(0,5)	0	0	0
БАП(1,0)	10,7±3,0	40,7±4,8	31,7±4,4
Кин(1,0)	13,1±3,5	20,8±3,9	17,2±3,7
НУК(0,1)+Кин(0,1)+Ад(1,0)	31,8±4,4	89,7±3,3	15,5±3,0
НУК(0,5)+Кин(0,5)+Ад(1,0)	59,6±4,9	78,5±4,3	23,7±4,1
НУК(0,5)+БАП(0,5)+Ад(1,0)	40,1±4,6	97,8±2,2	49,8±5,0
БАП(0,5)+Ад(1,0)	16,2±3,3	45,5±4,8	46,9±4,9
Кин(0,5)+Ад(1,0)	21,3±4,1	31,7±4,3	6,9±2,1

**Рис. 7.3 Индукция соматического эмбриогенеза и развитие проростков в каллусной культуре фенхеля сорта Мэрцишор**



Одним из основных факторов, определяющих направленность процессов в культуре органов и тканей, является состав питательной среды. При анализе данных об индукции морфогенеза в каллусе из экспланта стеблевого происхождения сорта Мэрцишор было установлено, что питательная среда с введением 2,4-Д не способствовала индукции морфогенеза (см. табл. 7.1). Введение только цитокинина (БАП или Кин) было малоэффективным (частота морфогенеза не превышала 13,1%). При сочетании БАП или Кин с НУК или Ад произошло достоверное

повышение интенсивности морфогенеза. Максимальная частота индукции соматического эмбриогенеза у этого сорта была достигнута при добавлении в среду 0,5 мг/л Кин, 0,5 мг/л НУК и 1,0 мг/л Ад (59,6%). При этом в большинстве случаев достоверное превышение изучаемого показателя произошло за счет введения в среду аденина.

Для каллусных культур, полученных из эксплантов зародышей и гипокотили, выявлены сходные закономерности – высокую частоту морфогенеза отмечали при использовании сред с БАП и НУК или при их сочетании с аденином. Следует обратить внимание на то, что на безгормональной среде у всех типов эксплантов с низкой частотой также наблюдали индукцию эмбриогенеза в каллусе (см. табл. 7.1). Данный факт, по-видимому, обусловлен тем, что первоначальная индукция морфогенеза происходила еще на среде для каллусогенеза, содержащей 2,4-Д, а последующий перенос каллусов на среды с НУК, БАП и Ад способствовал дальнейшему прохождению этого процесса, появлению и развитию зародышей. Возможно, это является причиной незначительных различий в частоте морфогенеза между средами разного гормонального состава. Во многих публикациях указывают на важную роль 2,4-Д в индукции соматического эмбриогенеза в каллусных культурах, при этом исключение этого регулятора роста из состава среды способствует дальнейшему развитию зародышей и регенерации растений [382, 407, 503, 505, 572, 602].

С целью усовершенствования методики получения регенерантов изучено влияние типа экспланта на морфогенную способность каллусных культур. В качестве эксплантов использовали сегменты стебля молодых растений, а также зародыши из зрелых семян и гипокотили 3-4-х недельных проростков *in vitro*. Как видно из полученных экспериментальных данных, почти на всех проанализированных средах, частота индукции морфогенеза при культивировании каллусов из зародышей гораздо выше по сравнению с другими эксплантами (см. табл.7.1). У других изученных сортов фенхеля также наблюдали увеличение частоты каллусо- и морфогенеза при использовании эксплантов зародышей по сравнению со стеблевыми сегментами.

Для получения каллусов и растений *in vitro* часто культивируют зрелые и незрелые зародыши [10, 37, 83, 224, 284, 315], что связано с наличием у них активно растущих меристематических тканей. По сравнению с сегментами стебля зародыши являются более удобным эксплантом, который можно использовать в любое время года без

специального выращивания донорных растений. В литературе имеются сведения о применении культуры незрелых зародышей фенхеля для получения гибридов [170]. Для многих видов растений достаточно часто используются экспланты из молодых проростков, выращенных из семян *in vitro* [10, 49, 179, 235, 326, 373, 575, 591]. Данный подход также позволяет получать стерильные экспланты в удобное для исследователя время. В предварительных опытах при использовании в качестве эксплантов различных органов (семядоля, гипокотиль, корешок) из проростков, полученных из семян *in vitro*, у сортов Мэрцишор и Оксамит Крыма показана возможность индукции каллуса. При этом морфогенетическими потенциями обладали только каллусы из гипокотилия. Частота морфогенеза в каллусных культурах этого типа зависела от состава питательной среды, сорта и количества пассажей (табл. 7.1; 7.2). По-видимому, перспективным для регенерации растений фенхеля может быть использование разных типов эксплантов, что может повысить эффективность клеточных технологий.

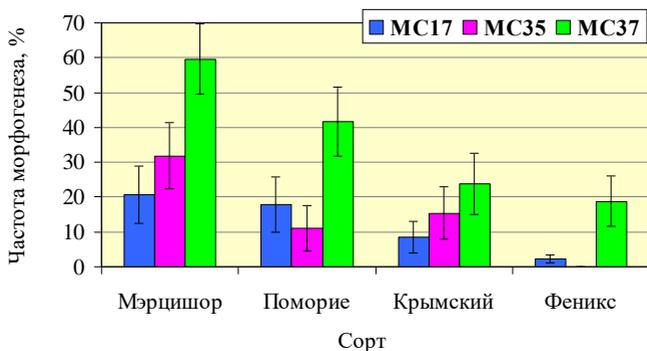
**Таблица 7.2 Влияние сорта, состава питательной среды и количества пассажей на частоту индукции морфогенеза в каллусах фенхеля, полученных из гипокотилия, %**

Сорт	Состав и концентрация регуляторов роста в среде МС, мг/л			
	БАП (0,5) + Ад (1,0)	БАП(1,0)+ НУК (0,5)	Кин(1,0)+ НУК(0,5)	БАП(0,5)+ НУК(1,0)
1 пассаж				
Мэрцишор	42,7±4,6	44,4±4,7	6,3±2,1	31,8±3,9
Оксамит Крыма	12,5±3,1	17,6±3,9	0	0
2 пассаж				
Мэрцишор	33,3±4,2	28,6±4,1	10,0±1,3	20,0±2,1
Оксамит Крыма	8,3±1,9	13,3±2,5	0	0
3 пассаж				
Мэрцишор	12,5±2,3	7,1±1,8	0	6,7±1,2
Оксамит Крыма	0	8,3±2,1	0	0
4 пассаж				
Мэрцишор	9,5±1,9	5,5±1,1	0	0
Оксамит Крыма	0	2,7±1,4	0	0

При исследовании процессов морфогенеза у фенхеля, также как и у многих других видов растений [112, 134, 221], отмечали снижение регенерационной способности по мере пассирования. У изученных сортов регенерацию растений наблюдали в 1-4-м пассажах (см. табл. 7.2), а затем каллусы в 5-7-м пассажах теряли морфогенетические потенции. Для

разработки клеточных технологий (получения соматклонов, клеточной селекции) желательно индуцировать регенерацию из длительно культивируемых тканей, что может повысить частоту соматклональной изменчивости.

Значительная часть исследований по фенхелю была посвящена изучению влияния генотипических особенностей на процессы морфогенеза в каллусной культуре. Установлено, что индукция соматического эмбриогенеза в культуре тканей фенхеля зависела от сорта (рис. 7.4). Наименьшая частота морфогенеза (до 18,8%) отмечена у сорта Феникс, у которого только на некоторых питательных средах наблюдали регенерацию. У сорта Мэрцишор этот показатель на всех средах был высоким и достигал 59,6% на среде МС37. Поэтому в дальнейшем при проведении экспериментов использовали этот сорт, проявляющий лучшую регенерационную способность.



**Рис. 7.4 Влияние сорта и состава питательной среды на индукцию морфогенеза в каллусной культуре фенхеля первого пассажа.**

Состав и концентрация регуляторов роста в среде МС (мг/л): МС17 – НУК (0,5)+Кин (0,5); МС35 – НУК (0,1)+Кин (0,1)+Ад (1,0); МС37 – НУК (0,5)+Кин (0,5)+Ад (1,0)

Фенхель является перекрестноопыляющимся растением, и все изучаемые сорта представляют собой сумму генотипов, различающихся по ряду морфологических и хозяйственно ценных признаков. В ряде работ, проведенных на основных сельскохозяйственных культурах было показано, что процессы каллусо- и морфогенеза генетически детерминированы [17, 43, 90, 119, 224]. Поэтому индивидуальные растения в пределах каждого сорта, по-видимому, могут различаться по способности к каллусообразованию и обладать различным

морфогенетическим потенциалом. В связи с этим изучали влияние генотипа индивидуального донорного растения фенхеля на процессы каллусо- и морфогенеза в культуре *in vitro*.

Для этого на питательную среду вводили сегменты стеблей, взятые из 14 растений сорта Мэрцишор. Полученные данные свидетельствуют о том, что отдельные растения сорта в значительной степени различались между собой по частоте индукции каллусо-, морфогенеза и интенсивности роста каллуса (табл. 7.3). У изученных растений частота каллусообразования варьировала от 0 до 100%, при этом у большинства растений частота индукции каллуса была достаточно высокой – от 72,4% до 100%. Следует отметить, что у растения №1 каллус на используемых средах не образовывался. То есть в сортовой популяции фенхеля, в целом характеризующейся высокой каллусообразующей способностью, могут появляться отдельные растения, у которых этот признак не проявляется. У анализируемых растений интенсивность пролиферации каллуса также различалась. При этом растения, отличающиеся высокой частотой образования каллуса, характеризовались и хорошим его приростом (см. табл. 7.3).

**Таблица 7.3 Влияние генотипа донорного растения фенхеля сорта Мэрцишор на каллусо- и морфогенез в культуре *in vitro***

№ донорного растения	Частота каллусогенеза, %	Интенсивность роста каллуса, балл	Частота морфогенеза, %
1	0	-	-
2	33,3±4,5	0,7±0,1	0
3	85,7±4,0	2,2±0,2	54,5±4,8
4	72,4±4,3	1,1±0,1	0
5	84,6±4,1	1,6±0,1	0
6	93,5±3,2	2,4±0,3	35,2±4,5
7	100	2,5±0,2	15,8±3,3
8	100	2,7±0,1	0
9	100	2,8±0,3	0
10	100	1,9±0,2	26,9±4,3
11	89,4±3,2	1,5±0,2	4,2±1,9
12	95,6±2,3	2,0±0,1	0
13	95,0±2,3	2,2±0,2	21,7±4,0
14	100	2,1±0,1	21,1±4,0

Для индукции морфогенеза каллусы всех изучаемых донорных растений переносили на среду для регенерации с добавлением НУК, Кин и Ад. Среди каллусных культур, полученных из эксплантов 13 разных

растений фенхеля, морфогенез наблюдали только у семи (см. табл. 7.3). При этом три растения (№№ 3, 6, 10) обладали относительно высоким морфогенетическим потенциалом (частота регенерации составила 54,5%, 35,2% и 26,9% соответственно). Вместе с тем, у растения №11 частота регенерации была на уровне 4,2%. Следовательно, у донорных растений фенхеля в пределах сорта в значительной степени выражена гетерогенность по способности к индукции образования каллуса и морфогенеза. При этом индукция соматического эмбриогенеза определялась генотипом донорного растения в значительно большей степени, чем индукция каллуса.

В литературе имеются сведения о внутрисортной изменчивости у некоторых видов растений. В частности, для каллусных культур клевера показана значительная вариабельность в пределах сорта по способности к регенерации [277]. У капусты брокколи были обнаружены различия в тотипотентности протопластов, выделенных из разных растений сорта Грин Комет [521]. Характеристика сорта по способности к каллусо- и морфогенезу складывается из характеристик отдельных растений. При этом гетерогенность генотипов, составляющих сорт, у фенхеля, как и у многих других перекрестноопыляющихся растений может в определенной степени снижать различия между сортами по изучаемому признаку. Выявленная вариабельность донорных растений в пределах сорта по способности к каллусо- и морфогенезу, по-видимому, обусловлена генетической детерминированностью этих процессов, что было показано в работах, проведенных на основных сельскохозяйственных культурах [112, 134, 224]. Наличие среди сортовой популяции растений, значительно различающихся по способности к каллусо- и морфогенезу, позволяет проводить у фенхеля отбор генотипов с высокой регенерационной способностью, а возможно, и передавать это признак при гибридизации.

Исследовано влияние гибридного происхождения донорного растения на индукцию процесса морфогенеза в каллусной культуре фенхеля. Установлено, что гибрид К34 × ‘Мэрцишор’ по частоте индукции морфогенеза *in vitro* превосходил родительские формы. Так, в каллусе 2-го пассажа, полученном из эксплантов стебля, частота соматического эмбриогенеза у гибрида составила 48,2 % , а у ‘Мэрцишора’ и образца К34 соответственно 26,7 и 29,5%. В каллусах из зародышей этих генотипов наблюдали аналогичную тенденцию (табл. 7.4). Следует отметить, что каллусы у сорта Мэрцишор сохраняли морфогенные потенции до 7-го пассажа и у образца К34 до 9-го пассажа, тогда как

морфогенез в каллусной ткани у гибрида наблюдали гораздо дольше – вплоть до 14-го пассажа. При изучении отдаленных гибридов злаков В.С. Гирко также показал, что каллусы, полученные из незрелых соцветий гибридов, отличались большим морфогенетическим потенциалом, по сравнению с родительскими формами [37].

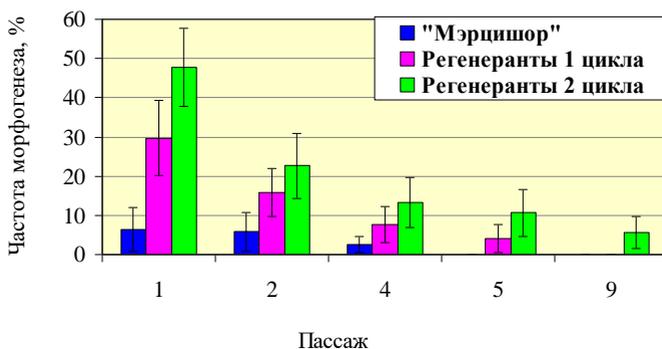
**Таблица 7.4 Влияние генотипа и длительности пассирования на индукцию морфогенеза в каллусе из зародышей фенхеля (%)**

Пассаж	Генотип		
	‘Мэрцишор’	К34 × ‘Мэрцишор’	К34
2	52,1±5,0*	96,4±2,2	72,4±4,4*
3	36,8±4,7*	94,1±2,1	48,5±4,9*
4	15,4±3,3*	82,6±3,9	40,6±4,8*
6	8,2±2,5*	66,8±4,6	26,8±4,1*
7	1,6±1,1*	61,6±5,0	15,8±3,4*
9	0	50,2±5,1	9,2±2,9*
11	0	34,4±4,5	0
12	0	18,7±3,6	0
14	0	3,8±1,5	0

\*Различия при сравнении с гибридом достоверны при  $p \leq 0,05$

Одним из интересных вопросов является исследование влияния эффективности использования растений-регенерантов в качестве донорных растений на морфогенетические процессы. Для этого получали каллусные культуры из эксплантов стебля исходного сорта Мэрцишор, а также из регенерантов R<sub>0</sub> 1-го и 2-го циклов. Регенеранты 1-го цикла получали из каллуса сорта Мэрцишор, а регенеранты 2-го цикла были получены из каллуса регенерантов 1-го цикла. После переноса каллусов разного происхождения на регенерационную среду в течение нескольких пассажей провели сравнительный анализ частоты морфогенеза (рис. 7.5). Полученные данные свидетельствуют о более высокой морфогенетической способности у растений-регенерантов, чем у исходного сорта. У регенерантов первого, и особенно второго цикла, частота морфогенеза во всех пассажах была в 2-5 раз выше, чем у ‘Мэрцишора’. При этом показано, что у фенхеля при использовании каллусов, полученных из регенерантов, можно не только повысить в несколько раз частоту морфогенеза, но и продлить до 5-9-го пассажей их способность к регенерации по сравнению с исходным сортом [60].

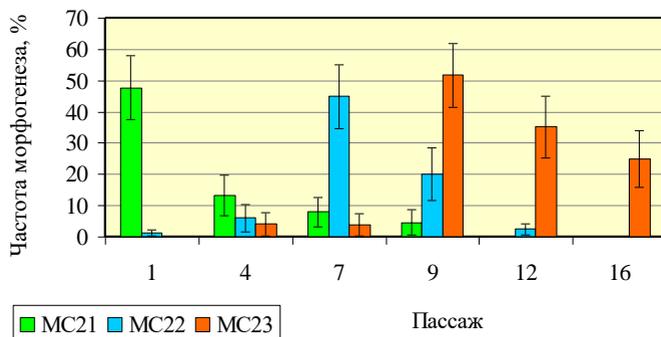
В частности, индукция соматического эмбриогенеза из каллуса стеблевого происхождения у сорта Мэрцишор наблюдалась с низкой частотой и только до 4-го пассажа (см. рис. 7.5). При использовании каллусных культур, полученных из регенерантов 1-го и 2-го циклов, частота морфогенеза возрастала до 29,7-47,7%, и морфогенетические потенции сохранялись до 5 и 9-го пассажей соответственно. Аналогичные результаты о повышении регенерационной способности каллусов, полученных из регенерантов, по сравнению с исходными сортами описаны и у некоторых других видов растений [4].



**Рис. 7.5 Влияние происхождения донорного растения фенхеля на частоту морфогенеза при длительном пассировании каллуса, полученного из стебля (регенеранты 1 цикла получены из каллуса сорта Мэрцишор; регенеранты 2 цикла – из каллуса регенерантов 1 цикла)**

На примере регенеранта № R<sub>2</sub>-109 выявлен эффективный прием, позволивший при смене гормонального состава питательной среды значительно повысить морфогенетический потенциал у длительно пассируемых каллусных культур фенхеля. При переносе каллуса, полученного из сегментов стебля, на среду МС21 соматический эмбриогенез отмечали до 9-го пассажа, при этом его частота снижалась с 47,7 до 1,5% (рис. 7.6). При изменении соотношения НУК и БАП (среда МС22), а затем замене БАП на Кин и Ад (среда МС23) индукция морфогенеза наблюдалась в более поздних 12-16-м пассажах. Как видно из представленных данных, модификация гормонального состава среды позволила не только увеличить частоту морфогенных каллусов, но и стимулировать соматический эмбриогенез в длительно культивируемом

каллусе [60]. Данный факт может быть обусловлен изменением в каллусах поздних пассажей уровня эндогенных фитогормонов, играющих важную роль в процессах морфогенеза и регенерации растений *in vitro* [26, 47, 107, 185, 186]. Это свидетельствует о необходимости изменения состава экзогенных гормонов в питательной среде.



**Рис 7.6 Влияние пассажа и состава питательной среды на индукцию морфогенеза в стеблевом каллусе фенхеля.**

Регуляторы роста в среде МС (мг/л): МС 21 – НУК (1,0)+ БАП (0,5); МС22 – НУК (0,1)+БАП (1,0); МС23 – НУК (0,1)+Кин (0,1)+Ад (1,0)

### 7.3 Микроразмножение и получение растений-регенерантов фенхеля *in vitro*

Одним из важнейших направлений исследования при разработке клеточных технологий является оптимизация условий микроразмножения *in vitro* для ускоренного размножения регенерантов. Для размножения фенхеля побеги, полученные из каллуса, разрезали на микрочеренки с 1 узлом длиной 7-8 мм. При их эксплантации на питательную среду через 1-2 недели отмечали развитие основного побега из пазушной почки и 1-2 адвентивных побегов у основания черенка. К концу пассажа формировался основной побег длиной до 7-8 см с 5-7 узлами и небольшие адвентивные побеги (1-2 см) с 1-2 листом. Поэтому при размножении использовали микрочеренкование основного и адвентивных побегов, что позволило увеличить коэффициент размножения.

В предварительных опытах установлено, что для развития микропобегов фенхеля необходимо введение в питательную среду кинетина и гибберелловой кислоты. Поэтому в дальнейшем при изучении

влияния генотипа и количества субкультивирований на эффективность размножения *in vitro* применяли среды с этими регуляторами роста. Анализ приведенных в табл. 7.5 данных показывает, что среда МС, содержащая 2,0 мг/л Кин и 0,1 мг/л ГК<sub>3</sub>, обеспечивала лучшее развитие микропобегов и высокий коэффициент размножения (8,1-9,0) у обоих генотипов. При этом основные показатели развития микрочеренков, особенно длина побега, и коэффициент размножения были выше у сорта Мэрцишор. У этого сорта отмечено корнеобразование у основания побега (до 58,3%), тогда как у К-34 ни на одной из питательных сред ризогенеза не выявлено.

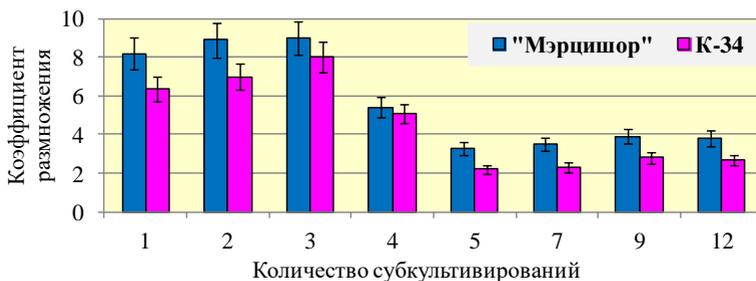
**Таблица 7.5 Влияние состава питательной среды и генотипа на микроразмножение фенхеля *in vitro* (3-е субкультивирование)**

Сорт, образец	Гормональные добавки в среде МС, мг/л	Длина побега, см	Количество		Частота ризогенеза, %	Коэффициент размножения
			побегов на эксплант, шт.	узлов на побег, шт.		
‘Мэрцишор’	Кин (0,5)+ ГК <sub>3</sub> (0,1)	3,4±0,4	2,5±0,3	2,7±0,3	26,8±3,1	6,7±0,8
	Кин (1,0)+ ГК <sub>3</sub> (0,1)	7,8±0,5	1,6±0,2	3,8±0,4	40,0±3,8	6,0±0,6
	Кин (2,0)+ ГК <sub>3</sub> (0,1)	7,9±0,5	2,6±0,2	3,5±0,4	58,3±6,0	9,0±0,8
К-34	Кин (0,5)+ ГК <sub>3</sub> (0,1)	2,0±0,3	1,8±0,3	2,6±0,3	0	4,7±0,4
	Кин (1,0)+ ГК <sub>3</sub> (0,1)	2,7±0,2	1,3±0,1	3,7±0,3	0	4,8±0,5
	Кин (2,0)+ ГК <sub>3</sub> (0,1)	5,6±0,3	2,4±0,2	3,3±0,4	0	8,1±0,7

Установлено существенное влияние на эффективность образования адвентивных побегов и на коэффициент размножения у фенхеля количества субкультивирований [63]. Высокие коэффициенты размножения у сорта Мэрцишор и образца К-34 (6,4-9,0) отмечены в первых трех пассажах (рис. 7.7). При последующих субкультивированиях (в 4-12-м) происходило снижение и относительная стабилизация этого показателя. Изменчивость коэффициента размножения, и, в частности, его увеличение в первых субкультивированиях, выявлены и у некоторых других видов растений [104, 122, 174, 593].

Важным этапом клонального микроразмножения является укоренение, при котором полученные побеги обычно переносят на питательные среды с добавлением ауксинов, измененным составом солей

или другими модификациями [31, 134, 138, 388, 505]. Как показали наши исследования, у некоторых сортов фенхеля на средах, используемых для размножения, происходило образование корней. Однако частота ризогенеза, как правило, не превышала 30-40%, а у образца К-34 формирования корней не отмечено ни в одном варианте опыта. Поэтому провели оптимизацию состава питательной среды для этого этапа размножения. Изучение влияния различных ауксинов (НУК, ИУК, ИМК) на корнеобразование микропобегов фенхеля *in vitro* выявлено преимущество использования ИМК.



**Рис. 7.7 Влияние количества субкультивирований и генотипа на коэффициент размножения у фенхеля**

При анализе влияния разных концентраций ИМК на ризогенез у микропобегов фенхеля установлено, что все варианты питательной среды с добавлением 0,1-2,0 мг/л ИМК способствовали образованию корней. Оптимальным было введение в среду 0,5 мг/л ИМК, что обеспечило достаточно высокую частоту укоренения (до 85,7 %) и формирование в течение 3-4 недель 4-6 корней длиной 20-35 мм. Полученные нами данные отличаются от результатов, представленных в работе J. Manoir с соавторами, в которой для французских сортов фенхеля при микроразмножении использовали среду МС с ИУК и БАП, а укоренение проводили на среде с добавлением ИУК [320].

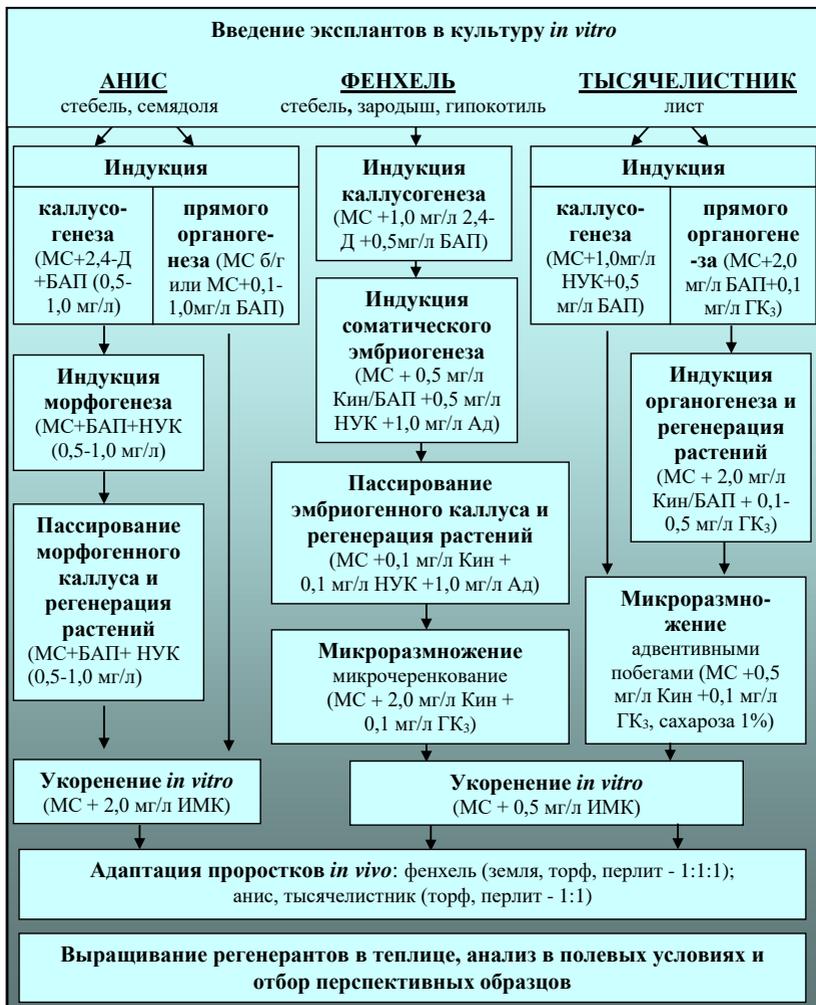
Полученные из каллусов укорененные регенеранты фенхеля, переносили для адаптации в условия *in vivo* в стаканчики со смесью дерновой земли, торфа и песка (1:1:1). Приживаемость микрорастений составляла от 52,1 до 68,0%, в зависимости от сорта и пассажа. Затем через 1-2 месяца растения переносили в почву и выращивали в полевых условиях, где после самоопыления получали семена R<sub>1</sub> (рис. 7.8). Следует отметить, что 20-30% регенерантов R<sub>0</sub> были стерильны и не завязали семена. Ряд

исследователей также обращали внимание на низкую приживаемость регенерантов фенхеля и отсутствие у них семян [378, 572]. Анализ регенерантов, полученных из каллусных культур 2-3-го пассажей сорта Мэрцишор, показал однородность этих растений по морфологии. При этом выделено 4 регенеранта, которые цвели почти на месяц позже исходного сорта; три из них также были более устойчивы к церкоспорозу, чем 'Мэрцишор'. Из каллусов фенхеля получено более 100 регенерантов, которые изучали по основным хозяйственно ценным признакам в полевых условиях [88]. Несколько регенерантов отличались высокой зимостойкостью. Показан широкий диапазон изменчивости по содержанию эфирного масла в плодах. Все изученные регенеранты фенхеля по урожайности зеленой массы превышали сорт Мэрцишор. Так, образец 812-21 превысил исходный сорт на 44,9% [88]. В качестве источников отдельных ценных признаков выделены регенеранты, представляющие интерес для селекции. Эти данные свидетельствуют о возможности получения измененных соматоклональных вариантов у фенхеля. В работе А. Bennici с соавт. было показано, что все регенеранты, полученные из каллуса путем органогенеза и соматического эмбриогенеза, имели нормальное число хромосом и не проявили ДНК полиморфизма [273]. С другой стороны, G. Hunault с соавт. при использовании регенерантов, полученных путем соматического эмбриогенеза *in vitro*, и классического метода гибридизации смогли в 5 раз повысить урожайность у фенхеля [449].



**Рис. 7.8 Регенеранты фенхеля (R<sub>1</sub>), полученные из каллуса сорта Мэрцишор, при выращивании в полевых условиях**

Полученные результаты позволили разработать способы длительной регенерации и размножения *in vitro* растений фенхеля, отраженные в биотехнологической системе (рис. 7.9).



**Рис. 7.9** Схема биотехнологической системы получения и размножения регенерантов фенхеля, аниса и тысячелистника *in vitro*

## ГЛАВА 8

### АНИС ОБЫКНОВЕННЫЙ (*ANISUM VULGARE GAERTN.*)

Анис обыкновенный (*Anisum vulgare* Gaertn., *Pimpinella anisum* L.), относящийся к семейству Сельдерейных (Apiaceae), известен с давних времен как пряно-ароматическое растение [7]. Его плоды применяют в хлебопечении, кулинарии, консервной промышленности, в производстве маринадов и солений. В плодах содержится до 3-5% эфирного масла, основным компонентом которого является анетол (80-90%) [164]. Препараты из плодов и эфирного масла используются как противовоспалительное, спазмолитическое, анестезирующее, отхаркивающее, коронарно-расширяющее средство и входят в состав ряда медицинских препаратов, применяемых при бронхитах, трахеитах, заболеваниях почек и органов пищеварения [151, 164, 173, 390, 512]. Часто галеновые препараты аниса назначают в сочетании с антибиотиками. Из плодов также получают до 16-22% жирного масла, используемого в мыловарении и лакокрасочном производстве [151, 194].

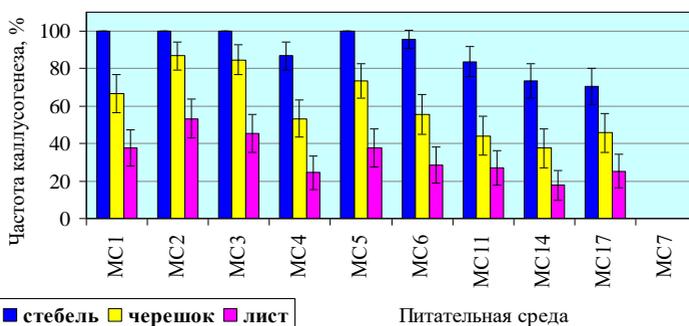
Анис – однолетнее травянистое растение со слабоветвящимся стеблем до 60 см высотой и листьями, имеющими различную форму, в зависимости от расположения. Мелкие белые или кремовые цветки собраны в сложные зонтики, состоящие из 7-15 простых зонтиков. На наружной и внутренней поверхности плода (двусемянки) имеются ребрышки, между которыми расположены канальца с эфирным маслом [151].

Основная масса публикаций по культуре изолированных тканей аниса связана с исследованием накопления вторичных метаболитов *in vitro* [249, 271, 331, 441, 518, 532]. Что касается изучения морфогенетических потенциалов изолированных культур этого вида, то в этом плане следует отметить работу по изучению влияния цитокининов на индукцию прямого побегообразования из различных эксплантов, выделенных из проростков [540]. Имеются также сведения об исследованиях, посвященных индукции соматического эмбриогенеза в каллусных культурах, полученных из сегментов корней, стеблей и апексов побегов [261, 269, 271, 329]. Эти работы, как правило, были проведены на местных популяциях или сортах аниса.

#### **8.1 Получение и характеристика каллусной культуры аниса**

В наших исследованиях при изучении процессов каллусо- и морфогенеза с целью разработки биотехнологической схемы получения

регенерантов аниса были использованы основные возделываемые в производстве сорта Парус и Артек, а также А-334 и сортообразец №546-81. При помещении на питательные среды сегментов стебля, листа и черешка листа наблюдали индукцию каллусогенеза, которая зависела от разных факторов, основными из которых были состав питательной среды и тип экспланта. Высокую частоту каллусообразования (до 100%) на всех средах отмечали при культивировании сегментов стебля, на которых была отмечена пролиферация компактного каллуса светло-зеленого цвета. При эксплантации сегментов черешка или листа частота индукции каллусогенеза была в 2-4 раза ниже (рис. 8.1).



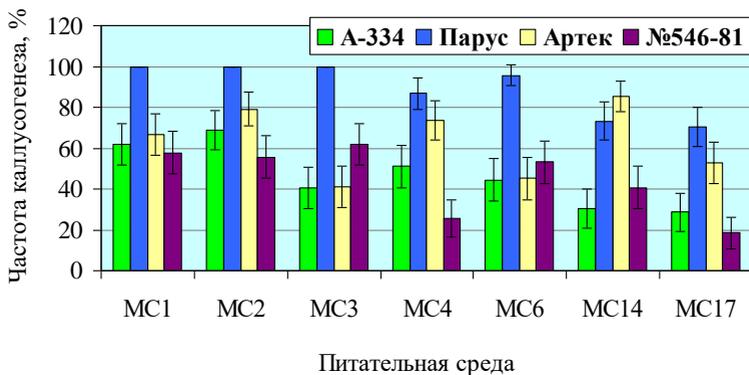
**Рис. 8.1** Влияние типа экспланта и состава питательной среды на индукцию каллусогенеза у аниса сорта Парус

Гормональные добавки в питательной среде MC (мг/л): MC1 – 2,4-Д (0,5)+БАП (0,1); MC2 – 2,4-Д (0,5)+БАП (0,5); MC3 – 2,4-Д (0,5)+БАП (1,0); MC4 – 2,4-Д (1,0)+БАП (0,1); MC5 – 2,4-Д (1,0)+БАП (0,5); MC6 – 2,4-Д (2,0)+БАП (0,1); MC11 – 2,4-Д (1,0); MC14 – НУК (1,0)+БАП (0,5); MC17 – НУК (1,0)+Кин (0,5); MC7 – 6/г

Из всех изученных регуляторов роста (2,4-Д, НУК, ИУК, Кин, БАП) у аниса наиболее благоприятное воздействие на индукцию образования каллуса из различных типов эксплантов оказывали 2,4-Д и БАП, что подтверждают данные, представленные на рис 8.1. На безгормональной среде MC7 формирования каллуса не наблюдали, а использование в качестве ауксина НУК совместно с Кин или БАП (MC 14, 17) было менее эффективно, чем 2,4-Д. Как видно из полученных результатов, у аниса индукция каллусогенеза из сегментов листьев и черешков лучше происходила при равном соотношении БАП и 2,4-Д или

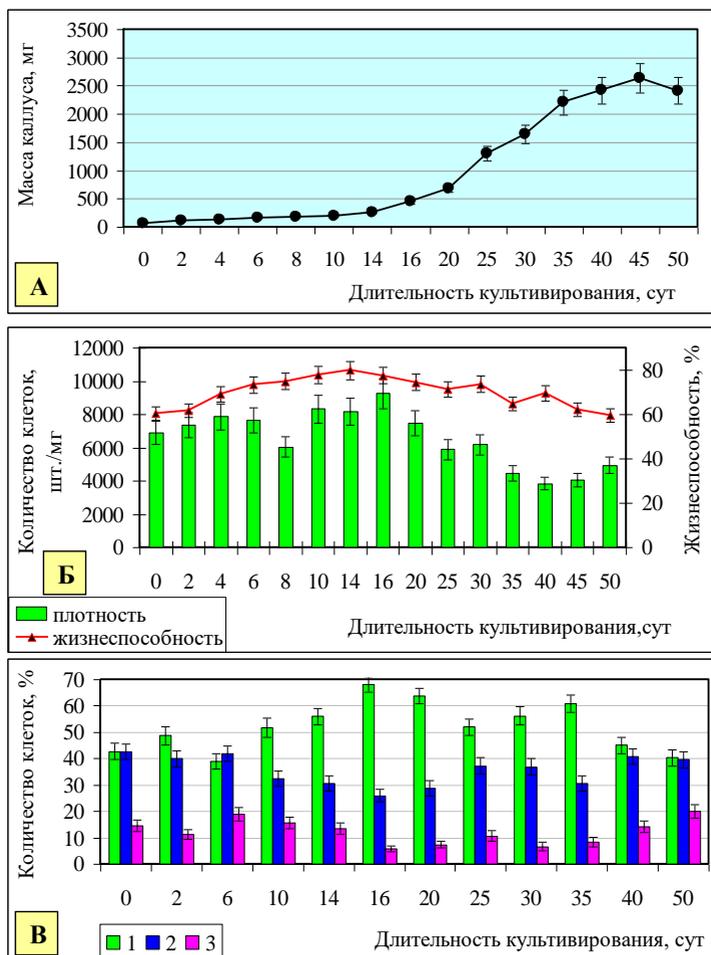
же преобладании в среде цитокинина – частота формирования каллуса из этих эксплантов достигала соответственно 53,3 и 86,7%. В то же время при эксплантации стеблевых сегментов различные сочетания этих регуляторов роста были одинаково эффективны и обеспечивали образование каллуса с частотой до 96-100%. Учитывая выявленные особенности, в дальнейших экспериментах использовали каллусные культуры из стеблей, которые пассировали на среде МС с добавлением 0,5 мг/л БАП и 2,4-Д.

Показано, что частота каллусогенеза у аниса зависела не только от гормонального состава питательной среды, но и генотипа. Максимальной способностью к индукции образования каллуса на испытанных питательных средах обладал сорт Парус, а у сортообразца №546-81 отмечена наименьшая частота этого процесса (рис. 8.2).



**Рис. 8.2 Влияние генотипа и состава питательной среды на индукцию каллусогенеза у аниса.** Состав питательных сред – см. рис. 3.10

Для характеристики ростовых процессов каллусной культуры аниса проанализировано изменение некоторых цитофизиологических параметров (массы сырого каллуса и его плотности, жизнеспособности клеточной популяции и содержания разных типов клеток) в цикле выращивания каллуса стеблевого происхождения 6-го пассажа (рис. 8.3). Установлено, что за цикл выращивания масса каллуса увеличилась более чем в 40 раз (РИ 43,3). У многих видов растений этот показатель обычно ниже, например, индекс роста каллусов элеутерококка колючего достигал 4-4,5, а у унгернии Виктора 3-5 [112].



**Рис. 8.3** Динамика изменения массы каллуса (А), плотности и жизнеспособности клеточной популяции (Б) и соотношения различных типов клеток (В) в цикле выращивания каллуса аниса сорта Парус

1 – клетки меристематического типа, 2 – паренхимные округлые, 3 – паренхимные гигантские клетки

В течение цикла выращивания популяция каллусных клеток фенхеля проходила основные фазы роста. Лаг-фаза была очень короткой и приходилась на 1-2-е сутки. На 2-е сутки отмечали достоверное

увеличение массы каллуса, и популяция клеток вступала в фазу логарифмического роста (см. рис. 8.3). При переходе в эту фазу роста отмечали небольшое повышение плотности и жизнеспособности.

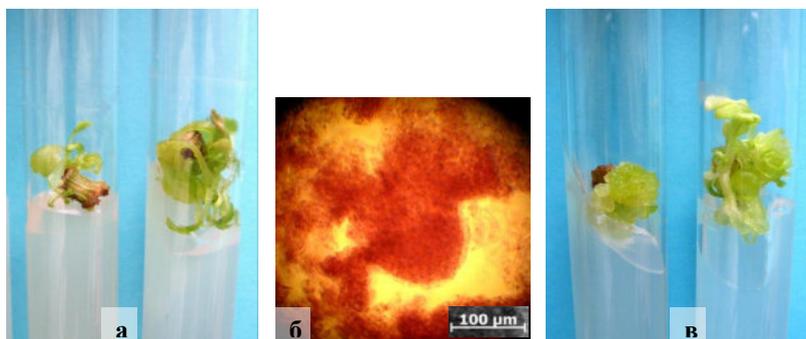
После 16 суток культивирования в каллусной культуре начиналась фаза линейного роста. В этот период наблюдали очень активный прирост биомассы – скорость роста с 20 по 35-е сутки составила 161,2 мг/сут. При этом происходила существенная перестройка популяции клеток, связанная с усилением митотической активности и появлением значительного количества мелких меристематических клеток, число которых достоверно возрастало с 14 суток. Увеличение числа клеток меристематического типа приводило к повышению жизнеспособности и плотности каллусной ткани, что также свидетельствует о переходе популяции клеток в линейную фазу роста. Примерно с 25-го дня клеточного цикла, интенсивность делений в клеточной популяции снижалась, и начинался рост клеток растяжением, что привело к уменьшению числа меристематических клеток и, как следствие, снижению в 1,5 раза плотности каллуса. Популяция культивируемых клеток аниса переходила в стационарную фазу роста на 40-е сутки культивирования, после чего не наблюдали достоверного прироста массы каллуса.

С этого периода в популяции клеток начинались процессы старения и деградаци, что приводило к усилению гибели клеток и снижению жизнеспособности каллуса до 59,7%. В конце пассажа в популяции значительно увеличилось количество паренхимных округлых (39-43%) и гигантских клеток (17-20%). Такой поздний переход популяции клеток в стационарную фазу свидетельствует о том, что оптимальная продолжительность пассажа у этого вида должна быть не менее 40-45 суток. Выявленная специфика динамики цитофизиологических параметров и продолжительность фаз роста каллусной культуры аниса существенно отличались от ряда видов растений [98, 134].

## **8.2 Индукция морфогенеза в культуре тканей и органов *in vitro* и регенерация растений**

Имеющиеся литературные данные по анису свидетельствуют о возможности индукции соматического эмбриогенеза в каллусной или суспензионной культуре путем введения в питательную среду АБК, пролина и протеинового гидролизата [269, 271, 329, 261]. В то же время в исследованиях А.М. Бугары показано, что в каллусах аниса реализация

морфогенного потенциала происходила путем органогенеза [22]. В ходе наших исследований установлено, что у аниса при создании определенных условий можно индуцировать органогенез (геммогенез) как в субкультивируемом каллусе, так и непосредственно из тканей экспланта (рис. 8.4). При введении в культуру *in vitro* сегментов стебля, черешков листа и семядолей на многих средах формировался каллус. Однако, наряду с началом каллусогенеза, в ряде случаев на поверхности эксплантов наблюдали закладку почек и развитие побегов (см. рис. 3.13а). Чаще всего адвентивное побегообразование отмечали при использовании сегментов стебля, у которых наблюдали формирование до 10-15 почек и побегов на один эксплант.

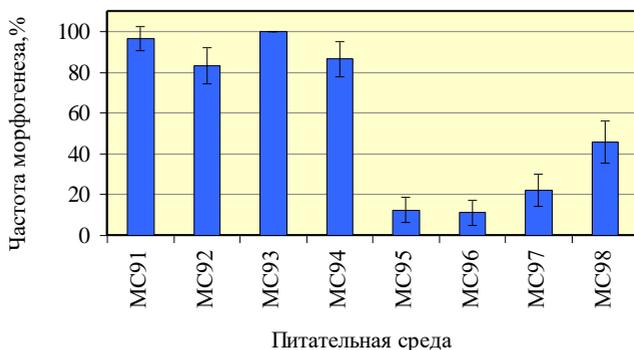


**Рис. 8.4** Индукция органогенеза из эксплантов стебля (а) и из каллуса стеблевого происхождения (в); апекс побега в каллусе (б) у аниса сорта Парус

Индукция прямого органогенеза в значительной степени зависела от состава питательной среды (рис. 8.5). Как видно из полученных данных, на средах, содержащих только 2,4-Д или ауксин в сочетании с БАП (МС95–МС97) частота регенерации была невысокой 11,1–22,2%. При увеличении концентрации цитокинина частота морфогенеза повысилась до 45,8% (МС 98). На этих средах также отмечали интенсивное развитие каллуса с частотой до 90-100%. На безгормональной среде (МС91) или средах с одним БАП (МС92 - МС94) происходила активная индукция прямого морфогенеза с частотой 83-100%.

Следовательно, у аниса индукция прямого морфогенеза из стеблевых эксплантов может происходить без введения в среду гормонов,

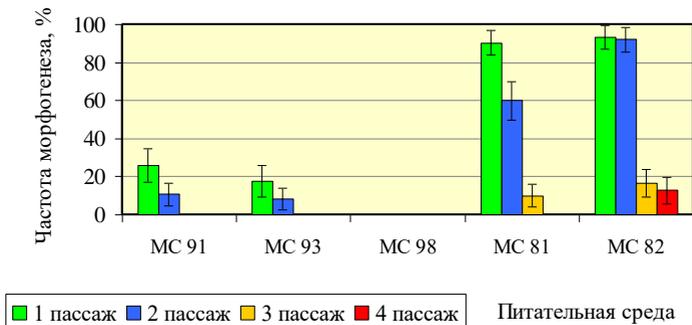
что может быть обусловлено достаточным уровнем эндогенных фитогормонов в тканях самого растения. В исследовании O. Rostiana, наоборот, было показано, что образование адвентивных побегов аниса проходило на средах с введением одного из цитокининов – Кин или ТДЗ [522]. Нами установлены особенности индукции прямого морфогенеза при использовании разных типов эксплантов. Так, при культивировании сегментов стебля наблюдали побегообразование по всей поверхности экспланта. У семян долей помимо образования адвентивных побегов иногда непосредственно из экспланта формировались корни. Культивирование черешков листа чаще всего приводило к образованию тератологических витрифицированных листьев.



**Рис. 8.5 Влияние состава питательной среды на частоту индукции прямого морфогенеза из стеблевых эксплантов у аниса сорта Парус.**  
 Гормональные добавки в питательной среде МС (мг/л): МС91 – б/г; МС92 – БАП (0,1); МС93 – БАП (0,5); МС94 – БАП (1,0); МС95 – 2,4-Д (0,5); МС96 – БАП (0,1)+2,4-Д (0,5); МС97 – БАП (0,5)+2,4-Д (0,5); МС98 – БАП (1,0)+2,4-Д (0,5).

При культивировании каллусов, полученных из сегментов стебля, на среде для каллусогенеза (с 2,4-Д и БАП) в течение нескольких пассажей признаков морфогенеза не отмечали. После переноса каллусов на среды разного гормонального состава на некоторых из них появлялись почки, из которых развивались побеги (см. рис. 8.4в). Непрямой морфогенез в значительной степени зависел от состава среды и длительности культивирования каллуса (рис. 8.6). Как видно из представленных данных, наибольшей эффективностью отличались среды с введением 0,5–1,0 мг/л БАП и НУК (МС81, МС82), на которых частота морфогенеза достигала 93,3%. Ранее в работе D. Ernst отмечалось, что

индукция непрямого соматического эмбриогенеза у аниса проходила без гормонов [331], в то же время J. Vela с соавторами указывали на необходимость присутствия 2,4-Д [271]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что способность к морфогенезу в каллусной культуре аниса снижалась по мере увеличения длительности субкультивирования. В четвертом пассаже морфогенез с небольшой частотой (12,8%) отмечали только на среде МС82. В следующих пассажах образования почек и побегов не наблюдали ни на одной среде.

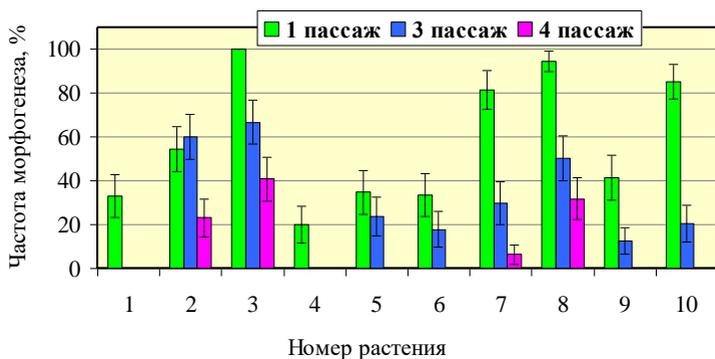


**Рис. 8.6** Влияние состава питательной среды и пассажа на частоту индукции морфогенеза в каллусной культуре аниса сорта Парус.

Гормональные добавки в питательной среде МС (мг/л): МС81– БАП (0,5)+НУК (0,5); МС82– БАП (0,5)+НУК (1,0); остальные– см. рис. 3.14

При изучении влияния генотипических особенностей донорных растений на морфогенез в каллусной культуре установлено, что способность к органогенезу и длительность сохранения морфогенетического потенциала в значительной степени зависели от индивидуального растения в пределах сорта Парус (рис. 8.7). У растений №№ 3, 7, 8, 10 отмечена максимальная частота побегообразования в каллусе (до 82-100%), при этом морфогенез наблюдали вплоть до 4-го пассажа. Каллусы, полученные из других растений, имели более низкую регенерационную способность, полная потеря которой происходила после 3-го пассажа. Такая внутрисортная изменчивость морфогенетических потенциалов каллусов, по-видимому, обусловлена генетической детерминированностью процесса морфогенеза, и ее можно использовать для отбора более «отзывчивых» генотипов аниса.

Исследовано влияние происхождения донорного растения аниса на морфогенетические потенции каллусов, при этом в качестве донорных использовали исходный сорт Артек и полученный из него регенерант (R<sub>0</sub>). Установлено, что при выделении эксплантов стебля из регенеранта частота индукции морфогенеза повышалась по сравнению с сортом, в частности, в 3-м пассаже – с 69,3 до 90,5%, а в 5-м – с 18,2 до 76,8%. Использование регенеранта также способствовало более длительному сохранению морфогенетических потенций. У каллусов из ‘Артека’ формирование почек наблюдали до 5-го пассажа, а у регенеранта до 9-го.



**Рис. 8.7 Влияние индивидуального донорного растения аниса сорта Парус на частоту морфогенеза при длительном пассировании каллуса**

Как и в случаях прямого морфогенеза, у аниса при формировании побегов из каллуса не было отмечено образования корней. Поэтому для получения полноценных растений их необходимо переносить на среды для ризогенеза. При анализе влияния различных ауксинов (ИУК, НУК, ИМК) на стимуляцию корнеобразования выявлен положительный эффект НУК и ИМК (в концентрации 1,0-2,0 мг/л). На этих средах частота ризогенеза колебалась от 41,3 до 96,9%. Однако при введении в среду НУК частота корнеобразования была ниже по сравнению с ИМК, кроме того, у основания побегов иногда образовывался небольшой каллус. Увеличение содержания ИМК с 0,1 до 2,0 мг/л способствовало значительному повышению частоты ризогенеза. На оптимальной питательной среде с введением 2,0 мг/л ИМК частота укоренения составила 96,9%, при этом формировалось 3-4 корня длиной 25-35мм. Укорененные растения для дальнейшей адаптации *in vivo* переносили в

смесь торфа и перлита (1:1), в которой приживаемость составила 82-90%. После этого регенеранты выращивали в полевых условиях (рис. 8.8) для дальнейшего анализа и включения в селекционный процесс.

Установленное разнообразие морфогенетических реакций в культуре изолированных тканей и органов аниса позволяет использовать их в разных клеточных технологиях. Индукция прямого морфогенеза из тканей экспланта может применяться для ускоренного размножения ценных генотипов, что было показано для ряда видов растений [9, 199, 205, 273]. Непрямой морфогенез из каллусных культур, благодаря явлению соматклональной изменчивости, может быть использован для получения генетически разнообразных форм в селекции. В наших исследованиях подобраны условия, способствующие длительному сохранению способности к индукции непрямого морфогенеза (до 4-9 пассажей), что может повысить вероятность получения соматклонов, поскольку по мере культивирования каллусных тканей возрастает их генетическая гетерогенность [112]. Разработанные приемы и схема получения регенерантов аниса нашли отражение в биотехнологической системе, представленной на схеме (см. рис. 7.9).



**Рис. 8.8 Растения-регенеранты аниса, полученные из каллусных культур сорта Парус, при выращивании в полевых условиях**

## ГЛАВА 9

### ТЫСЯЧЕЛИСТНИК (*ACHILLEA* SPP.)

Многие представители рода *Achillea* используются в парфюмерно-косметическом производстве, медицине, ароматерапии, в качестве пряности для изготовления кондитерских и ликероводочных изделий, а также как декоративные растения [151, 173]. Для получения эфирного масла чаще применяется широко распространенный в Европе и Азии тысячелистник обыкновенный (*Achillea millefolium* L.), относящийся к семейству Астровые (Asteraceae) [151, 164]. Это многолетнее травянистое растение, высотой 20-80 см, с тонким ползучим корневищем, от которого отходят побеги с розетками прикорневых листьев и цветоносные стебли. Листья очередные, ланцетные, дважды- или трижды- перисторассеченные. Цветки мелкие белые, иногда розовые, собраны в соцветия корзинки, которые образуют сложный щиток. Язычковых цветков 5, они белые, редко розовые, тычиночных обоеспольных цветков 14-20. Размножают тысячелистник семенами или отрезками корневищ. Листья и цветки содержат алкалоид ахиллеин, витамин К, сесквитерпены, дубильные вещества, флавоноиды и до 1% эфирного масла, в состав которого входят азулены (25-30%), сложные эфиры (10-13%), камфора, пинен, борнеол, туйон и другие компоненты [151]. В медицине это растение используется как кровоостанавливающее, противовоспалительное, обезболивающее, успокаивающее, мочегонное, сосудорасширяющее, противоаллергическое, желчегонное, ранозаживляющее и бактерицидное средство [390].

Имеющиеся в литературе сведения по культивированию тканей и органов тысячелистника *in vitro* весьма ограничены и в основном затрагивают вопросы микроразмножения [598], накопления эфирного масла в суспензионной культуре или в культуре трансформированных корней [340, 435]. Так, турецкие исследователи провели оптимизацию питательных сред для индукции множественного побегообразования из верхушек побегов и сегментов корня у *A. millefolium* [587]. Изучены особенности получения каллусных культур и индукции морфогенеза у *A. ptarnica*, *A. collina*, *A. nobilis*, *A. millefolium* [297, 338]. Однако в доступных литературных источниках практически не освещены вопросы, касающиеся длительного субкультивирования каллуса и влияния различных факторов на индукцию морфогенеза, а также получения в культуре тканей регенерантов и их анализа.

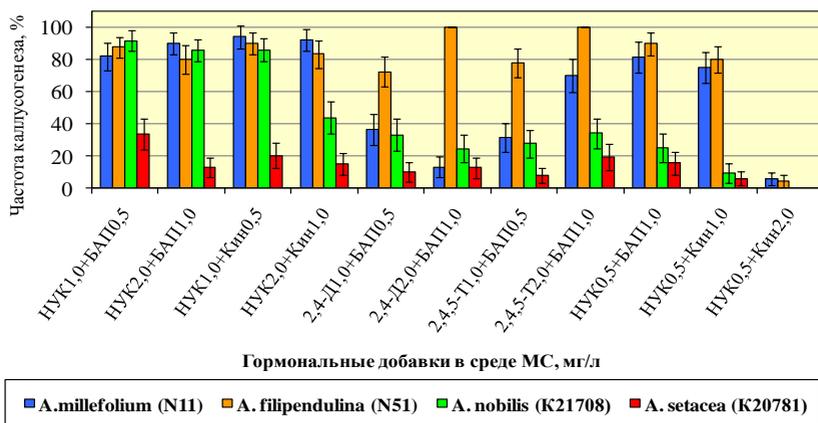
## 9.1 Получение и длительное пассирование каллусных культур некоторых видов тысячелистника

В наших исследованиях использованы: тысячелистник обыкновенный (*Achillea millefolium* L.) – сорт эфиромасличного направления Эней [164] и образцы №№ 11, 122, К20886, К20893; тысячелистник лабазниковый (*A. filipendulina* Lam.) – образцы №51, К21796, тысячелистник щетинистый (*A. setacea* Waldst. et Kit.) – К20781 и тысячелистник благородный (*A. nobilis* L.) – К21708. При введении в изолированную культуру сегментов стеблей и высечек листьев (выделенных из растений закрытого грунта) наблюдали каллусогенез у всех изученных видов и перспективных образцов тысячелистника. Показано, что на большинстве испытанных сред частота формирования каллуса у листовых эксплантов была в 1,5-1,8 раз выше, чем у стеблевых. В частности, у *A. millefolium* из сегментов стебля и листа частота каллусогенеза была соответственно 87,9 и 59,3%, а у *A. filipendulina* – 91,8 и 53,2%. А.С. Figueiredo и М.С. Pais при сравнении разных типов эксплантов у *A. millefolium* (лист, стебель растения и гипокотиль и семядоля проростков *in vitro*) отмечали, что лучшей способностью к каллусогенезу обладали гипокотили [338]. В другой работе у *A. collina* для получения каллуса использовали экспланты листа [297]. Поскольку в наших экспериментах экспланты из листа обеспечивали высокую частоту каллусогенеза (до 80-100%), в дальнейших исследованиях был использован этот тип экспланта.

У *A. millefolium* при введении высечек листа в изолированную культуру через неделю культивирования начиналось образование плотного зеленого каллуса с небольшими бурыми участками по краям, а у других видов образовывался компактный светло-бежевый зернистый каллус с отдельными зелеными или бурыми зонами. Важнейшим фактором, определяющим процесс каллусогенеза, является гормональный состав питательной среды. В предварительных экспериментах установлено, что у *A. filipendulina* на безгормональной среде МС, а также при введении в среду 1,0-2,0 мг/л цитокинина (Кин, зеатина, БАП) каллус практически не формировался, а использование одного из ауксинов (НУК, 2,4-Д, ИУК) в концентрации 1,0-2,0 мг/л было малоэффективно. Поэтому в дальнейшем у четырех видов тысячелистника проанализировали влияние на индукцию каллусогенеза питательных сред, дополненных и цитокинином, и ауксином (рис. 9.1). Как видно из представленных данных, у всех видов более эффективным для индукции образования

каллуса было использование 1,0-2,0 мг/л НУК и 0,5-1,0 мг/л БАП или Кин. Наибольшая частота каллусогенеза у всех изученных видов (от 33,8 до 91,7%, в зависимости от вида) отмечена на среде МС с 1,0 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП. Полученные нами данные отличаются от работы А.С. Figueiredo и М.С. Pais, в которой для индукции каллуса у *A. millefolium* использовали среду Гамборга В5, дополненную 1,5 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л Кин [338].

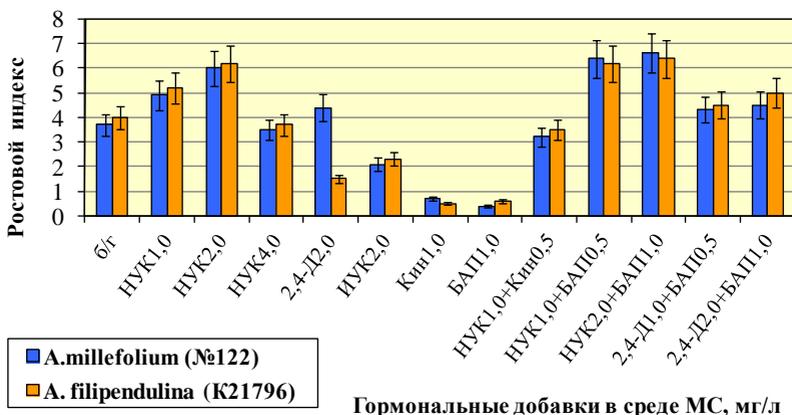
Как видно из данных рис. 9.1, индукция каллусогенеза у тысячелистника в значительной степени зависела от вида. Максимальная частота образования каллуса на большинстве питательных сред отмечена у *A. filipendulina* (до 100%) и *A. millefolium* (до 94%). Меньшей способностью к индукции каллусогенеза характеризовались экспланты *A. setacea*, у которых каллус формировался с частотой 10-33% и отличался очень слабым приростом.



**Рис. 9.1** Влияние состава питательной среды и вида на индукцию каллусогенеза из эксплантов листа у тысячелистника

При длительном выращивании каллусной ткани в пересадочной культуре у двух видов тысячелистника отмечено варьирование ростового индекса в зависимости от гормонального состава питательной среды (рис. 9.2). Минимальный ростовой индекс (до 0,8) отмечен на средах с одним из цитокининов (БАП, Кин). Введение в среду ауксина 2,4-Д или ИУК (2,0 мг/л) способствовало повышению прироста массы каллуса, хотя ростовой индекс не превышал 4,4. Почти такой же прирост каллуса был на

безгормональной среде. Лучшую пролиферацию каллуса наблюдали на модификациях среды МС, содержащих 1,0-2,0 мг/л НУК или этот ауксин в сочетании с 0,5-1,0 мг/л БАП. У *A. millefolium* и *A. filipendulina* установлены сходные закономерности изменения массы каллуса, при этом максимальный ростовой индекс (до 6,6) был на среде МС160 (см. рис. 9.2), которую использовали и при дальнейшем субкультивировании каллуса.



**Рис. 9.2** Влияние гормонального состава питательной среды на прирост каллуса 4-го пассажа, полученного из листовых эксплантов тысячелистника

При длительном культивировании каллуса тысячелистника обыкновенного установлено, что с первого по четвертый пассаж происходило постепенное повышение ростового индекса с  $4,1 \pm 0,4$  до  $6,1 \pm 0,5$ . Затем этот показатель немного снизился. При дальнейшем пассировании в течение 6-12-го пассажей ростовой индекс достоверно не изменялся и был в пределах  $5,2-5,6$ .

## 9.2 Индукция морфогенеза из эксплантов и каллусов *in vitro*

Наиболее сложной проблемой при разработке клеточных технологий является стабильная индукция морфогенеза *in vitro*. Для выявления морфогенетических потенциалов тысячелистника проанализировано действие более 40 вариантов питательных сред МС на развитие листовых эксплантов и полученных из них каллусов в течение 1-5 пассажей у *A. millefolium*, *A. filipendulina*, *A. nobilis* и *A. setacea*.

Большая часть использованных модификаций сред, включающих различные сочетания и концентрации БАП, Кин, зеатина, НУК, ИУК, ИМК, 2,4-Д, ГК<sub>3</sub>, была неэффективной, и визуальных признаков морфогенеза не выявлено. Лишь на нескольких вариантах сред, в основном представленных в табл. 9.1, у трех видов тысячелистника при эксплантации сегментов листа наблюдали каллусогенез, а также прямой или непрямого органогенез из формирующегося каллуса. Наиболее интенсивно (с частотой до 56,3%) из эксплантов или первичного каллуса у изученных генотипов происходило образование корней. Индукция почек, а затем побегов непосредственно из листьев отмечена только у *A. millefolium* (сорт Эней и К20886) с частотой от 6,7 до 13,3% (см. табл. 9.1). У этого же вида в первичном каллусе с частотой до 23,3% наблюдали регенерацию почек и побегов.

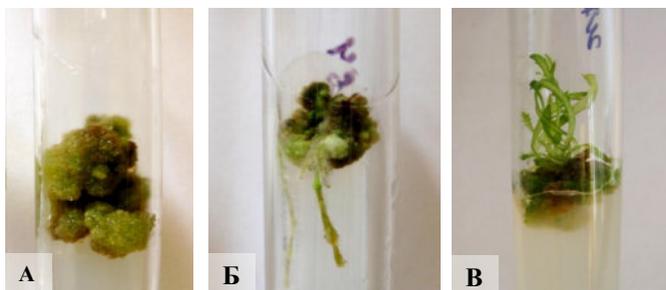
**Таблица 9.1 Влияние гормонального состава питательной среды и генотипа на индукцию каллусо- и морфогенеза у тысячелистника**

Вид (образец)	Концентрация регуляторов роста, мг/л	Частота, %		
		каллусо- генеза	ризогенеза	побегооб- разования
<i>A. millefolium</i> (К20886)	БАП 2,0	0	3,8±1,1*	0
	БАП 1,0+НУК 0,5	93,3±3,7	20,0±4,5*	6,7±2,3*
	Кин 1,0+НУК 0,5	75,0±5,6	30,3±4,6*	8,3±2,9*
	НУК 1,0+БАП 0,5	90,0±3,9	56,3±6,1**	23,3±4,9*
	БАП 2,0+ГК <sub>3</sub> 0,1	6,7±2,5	42,7±5,1*	21,6±4,5*
<i>A. millefolium</i> (К20893)	НУК 1,0+БАП 0,5	89,7±4,0	22,2±4,1**	11,1±3,5*
	БАП 2,0+ГК <sub>3</sub> 0,1	4,6±2,5	27,3±4,0**	22,2±4,5*
	Кин 2,0+ГК <sub>3</sub> 0,5	0	0	0
<i>A. millefolium</i> ("Эней")	НУК 1,0+БАП 0,5	84,5±4,7	15,3±3,7*	13,3±3,1*
	БАП 2,0+ГК <sub>3</sub> 0,1	2,8±1,2	9,8±3,0*	0
	Кин 2,0+ГК <sub>3</sub> 0,5	0	5,8±2,1*	0
<i>A. filipendulina</i> (№ 51)	Кин/БАП 2,0	0	0	0
	БАП 1,0+НУК 0,5	92,2±3,9	0	0
	Кин 1,0+НУК 0,5	80,0±5,7	0	0
	Кин 2,0+ГК <sub>3</sub> 0,5	4,4±1,9	15,8±23,1*	0
	Кин 2,0+ГК <sub>3</sub> 0,1	0	5,6±2,3*	0
<i>A. nobilis</i> (К21708)	БАП 2,0+ГК <sub>3</sub> 0,1	0	0	0
	НУК 1,0+БАП 0,5	90,9±3,9	4,7±2,1**	0
	Кин 2,0+ГК <sub>3</sub> 0,5	0	0	0

\*Образование побегов или корней из эксплантов.

\*\*Образование побегов или корней из каллусов и эксплантов.

При индукции побегов в каллусе появлялись ярко зеленые зоны, в которых формировались почки, а затем проростки (рис. 9.3). Побегообразование иногда сопровождалось образованием утолщенного корня, напоминающего корневище, на котором изредка наблюдали закладку почек и рост дополнительных побегов. Цитологический анализ каллусных тканей показал наличие меристематических клеточных комплексов, в зоне которых происходила дифференциация конусов нарастания и образование почек, из которых развивались побеги, что свидетельствует о регенерации растений у тысячелистника путем органогенеза. Аналогичную одновременную индукцию каллусогенеза, ризогенеза и побегообразования отмечали и у некоторых других видов растений [138, 591].



**Рис. 9.3 Формирование каллуса (А), индукция корнеобразования (Б) и регенерация побегов (В) у *A. millefolium***

Для регенерации растений большой интерес представляет, конечно, побеговый органогенез. Как видно из представленных данных, индукцию образования побегов из эксплантов листа наблюдали на нескольких средах, дополненных БАП или Кин (0,5-1,0 мг/л) в сочетании с НУК или ГК<sub>3</sub> (см. табл. 9.1). При этом видна значительная зависимость этого процесса от вида – только у тысячелистника обыкновенного происходило образование почек при прямом или непрямом морфогенезе в первичном каллусе.

В дальнейшем при субкультивировании каллусных тканей в 1-3-м пассажах также наблюдали формирование корней и почек (табл. 9.2). В отличие от первичного, в пассируемом каллусе побегообразование происходило у трех изученных видов – *A. millefolium*, *A. filipendulina* и *A. nobilis*. Только у *A. setacea* в этих экспериментах не удалось индуцировать геммогенез. Представленные данные свидетельствуют о

значительном влиянии на индукцию органогенеза не только генотипа, но и гормонального состава среды. Формирование почек у *A. millefolium* К20886 (с частотой до 30,4 %) отмечали на среде МС с 2,0 мг/л БАП и 0,1 мг/л ГК<sub>3</sub> в течение 1-2-го пассажей; у сорта Эней (с частотой 2,8%) – на среде с БАП и НУК только в первом пассаже. У *A. millefolium* (К20893), у которого в первичном каллусе образовывались почки, в пассируемом каллусе их не выявили (см. табл. 9.2). Вместе с тем у *A. filipendulina*, у которого при введении в культуру не было отмечено почек и побегов, в каллусе в течение трех пассажей на среде МС с 2,0 мг/л Кин и 0,1-0,5 мг/л ГК<sub>3</sub> эти структуры развивались. У *A. nobilis* геммогенез с небольшой частотой выявили в 1-2-м пассажах также на среде с 2,0 мг/л Кин и 0,5 мг/л ГК<sub>3</sub>.

**Таблица 9.2 Влияние состава питательной среды и генотипа на индукцию морфогенеза при пассировании каллуса тысячелистника**

Вид (образец)	Концентрация регуляторов роста, мг/л	1пассаж		2пассаж	
		ризогенез, %	побегообразование, %	ризогенез, %	побегообразование, %
<i>A. millefolium</i> (К20886)	БАП 2,0	0	0	-	-
	БАП 1,0+ НУК 0,5	8,4±0,9	0	3,8±0,4	0
	Кин 1,0+ НУК 0,5	0	0	2,5±0,5	0
	НУК 1,0+ БАП 0,5	16,4±2,1	0	6,6±0,8	0
	БАП 2,0+ ГК <sub>3</sub> 0,1	17,5±2,2	30,4±5,8	12,1±1,3	9,1±1,0
<i>A. millefolium</i> (К20893)	НУК 1,0+ БАП 0,5	6,3±0,8	0	2,1±0,9	0
	БАП 2,0+ ГК <sub>3</sub> 0,1	11,5±1,9	0	0	0
<i>A. millefolium</i> (“Эней”)	НУК 1,0+ БАП 0,5	7,3±0,8	2,8±0,3	6,0±0,7	0
	БАП 2,0+ ГК <sub>3</sub> 0,1	0	0	-	-
<i>A. filipendulina</i> (№ 51)	Кин/БАП-2,0	0	0	-	-
	БАП 1,0+ НУК 0,5	0	0	0	0
	Кин 1,0+ НУК 0,5	0	0	0	0
	Кин 2,0+ ГК <sub>3</sub> 0,5	21,5±2,1	20,0±1,8	10,7±0,9	14,3±1,3
	Кин 2,0+ ГК <sub>3</sub> 0,1	17,3±1,9	13,6±1,9	10,0±0,8	5,8±0,4
	БАП 2,0+ ГК <sub>3</sub> 0,1	8,2±0,9	1,8±0,3	2,8±0,4	0
<i>A. nobilis</i> (К21708)	НУК 1,0+ БАП 0,5	6,4±0,9	0	2,2±0,4	0
	Кин 2,0+ ГК <sub>3</sub> 0,5	0	8,3±0,9	0	2,5±0,3

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о снижении морфогенетического потенциала у тысячелистника по мере пассирования каллуса (см. табл. 9.2), что характерно и для других видов

растений [26, 112, 134, 175]. В 3-м пассаже образование побегов с частотой 7,1% отмечено только у *A. filipendulina*, а в 4-м побегообразования не выявлено.

Исследовано влияние происхождения донорного растения на индукцию каллусо- и морфогенеза, при этом сравнивали растения исходных образцов (*A. millefolium* № 11 и *A. filipendulina* №51) и полученные из каллусов растения-регенеранты (R 704-2 и R 101-1). У исходных генотипов частота формирования проростков в каллусной культуре была соответственно 23,3 и 10,8 %, тогда как у регенерантов она увеличилась в 1,6 раз и составила 37,5 и 18,2 %. Аналогичный факт продемонстрирован для подсолнечника, у которого потомство регенерантов обладало более высокой регенерационной способностью по сравнению с исходным генотипом [4]. Установлено, что у тысячелистника можно отбирать отдельные каллусные штаммы с повышенной морфогенетической способностью, у которых в течение 10-12 пассажей происходила регенерация растений. Выявленные экспериментальные приемы позволяют увеличить регенерационный потенциал и получать растения с большей частотой и более длительный период, что может способствовать повышению эффективности разработанных методов и при длительном культивировании получать соматоклональные варианты.

Необходимо отметить, что возможность индукции прямого и непрямого морфогенеза в каллусных культурах селекционных образцов *A. millefolium*, *A. filipendulina* и *A. nobilis* была впервые показана в наших исследованиях [56]. Судя по имеющимся литературным сведениям, у *A. millefolium* и *A. nobilis* у эксплантов и в каллусе отмечался только ризогенез [296, 338]. Индукция побегообразования была получена у *A. collina* из листьев с частотой до 20% [297], а также у *A. ptarmica* из каллуса, культивируемого на среде МС с 2,4-Д [296].

### **9.3 Клональное микроразмножение и анализ растений-регенерантов**

С целью ускоренного размножения полученных регенерантов, а также других ценных образцов и сортов тысячелистника проведена оптимизация питательных сред для микроразмножения. В предварительных экспериментах выявлена низкая эффективность использования для размножения безгормональной среды МС и введения помимо цитокининов ауксинов, которые вызывали активный рост каллуса. Поэтому в дальнейшем изучали влияние на развитие микропобегов цитокининов (БАП и кинетин) и ГК<sub>3</sub>, а также содержания сахарозы и

макро- и микроэлементов (табл. 9.3).

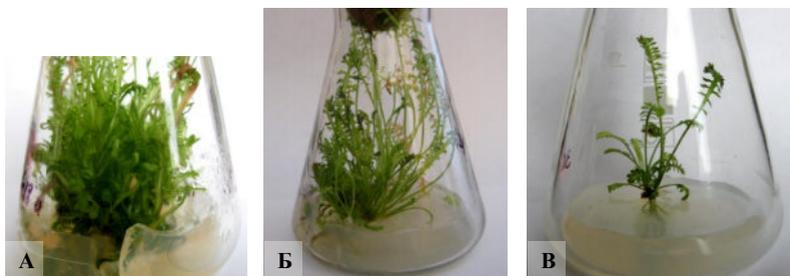
Полученные данные свидетельствуют о том, что, наряду с развитием дополнительных побегов, на некоторых средах происходило образование каллуса у основания побегов, а также развивались оводненные побеги (рис. 9.4 А). Уменьшение концентрации гормонов, сахарозы и макро- и микроэлементов в среде МС позволило снизить в несколько раз частоту этих нежелательных процессов. Однако в некоторых вариантах, в частности, при уменьшении вдвое содержания солей, уменьшилось и число побегов. Лучшей средой, на которой отмечен максимальный коэффициент размножения (6,8 побегов на эксплант) при незначительной частоте каллусогенеза и витрификации, была среда МС, содержащая 0,5 мг/л Кин, 0,1 мг/л ГК<sub>3</sub> и 1% сахарозы. Аналогичные данные о положительном влиянии уменьшения концентрации гормонов и солей на развитие побегов при микроразмножении и снижении их оводненности представлены и для других видов растений [115, 138].

**Таблица 9.3 Влияние состава питательной среды на развитие микропобегов *A. millefolium in vitro***

Гормональные добавки в среде МС, (мг/л)	Длина побега, см	Кол-во побегов, шт./эксплант	Частота образования, %		
			оводненных побегов	корней	каллуса
Кин(1,0)+ГК <sub>3</sub> (0,5), сахароза 1%	43,7±4,0	5,8±0,5	23,5±1,8	70,0±5,9	30,5±3,5
Кин(1,0)+ГК <sub>3</sub> (0,5), сахароза 2%	39,2±4,4	4,2±0,4	79,5±8,2	53,4±6,4	47,5±3,9
Кин(2,0)+ГК <sub>3</sub> (0,5), сахароза 2%	35,4±4,1	4,5±0,5	71,5±6,3	61,7±6,1	38,5±3,1
БАП(1,0)+ГК <sub>3</sub> (0,5), сахароза 1%	41,8±5,0	4,2±0,4	39,5±4,2	40,0±3,2	60,0±5,5
БАП(2,0)+ГК <sub>3</sub> (0,5), сахароза 2%	38,1±4,2	4,0±0,5	68,2±7,1	45,3±4,2	71,5±6,7
Кин(0,5), сахароза 1%	30,6±3,3	5,7±0,6	10,5±1,1	85,7±4,7	6,2±1,0
½ МС; Кин(0,5), сахароза 1%	32,8±4,1	3,9±0,4	14,2±2,2	80,0±5,2	0
Кин(0,5)+ГК <sub>3</sub> (0,1), сахароза 1%	49,6±5,0	6,8±0,5	4,0±4,3	82,2±5,1	10,0±1,2

Укоренение побегов достаточно успешно проходило на некоторых средах для размножения, достигая 80,0-85,7% (см. табл. 9.3). Однако при образовании большого числа побегов их можно разделять и для укоренения использовать среду МС с добавлением 0,5 мг/л ИМК, которая

позволила повысить частоту корнеобразования до 91,0-95,2 % у *A. millefolium* и *A. filipendulina*. На этой среде через 3-4 недели образовывалось в среднем  $5,8 \pm 0,4$  корня на побег длиной до 3-4 см (см. рис. 9.4 В). В то же время в работе А.У. Turker et al. максимальная частота укоренения микропобегов *A. millefolium* (100%) получена при их культивировании на среде МС с добавлением 0,5 мг/л НУК [587].



**Рис. 9.4** Образование оводненных побегов (А), множественное побегообразование (Б), укоренение *in vitro* (В) микропобегов *A. millefolium*

Для адаптации регенерантов тысячелистника укорененные проростки длиной 45-55 мм с 8-9 листьями переносили в обычные условия *in vivo* и выращивали первые 2-3 недели в торфо-перлитной смеси (1:1) при повышенной влажности 80-90%. Приживаемость составила от 88,2 до 92,5%, в зависимости от вида тысячелистника и пассажа. Через 1-2 месяца регенеранты переносили в вазоны с землей, а весной высаживали в поле (рис. 9.5).

При разработке клеточных технологий важным этапом является изучение регенерировавших *in vitro* растений. В имеющихся литературных источниках отмечалось, что растения тысячелистника, полученные при прямом побегообразовании *in vitro*, сохраняли генотип исходных видов [598]. При анализе в полевых условиях вегетативного потомства регенерантов *A. millefolium* и *A. filipendulina* по основным морфологическим признакам (окраска и форма листа, стебля, соцветия) существенных отклонений по сравнению с исходными образцами не отмечено. У обоих видов выделены регенеранты (до 7,3%), с более ранним сроком цветения (на 7 сут раньше исходных форм).



**Рис. 9.5** Адаптация в условиях *in vivo* (А) и регенеранты, полученные из каллуса *A. millefolium* (Б, В) и *A. filipendulina* (Г, Д)

По количественным показателям (высота и диаметр куста, число побегов, диаметр соцветия, урожай зеленой массы с растения, массовая доля эфирного масла) показана значительная вариабельность у регенерантов из каллусов тысячелистника обыкновенного (табл. 9.4). У регенерантов *A. filipendulina* выявлены сходные закономерности.

Расширение изменчивости исследуемых признаков у регенерантов тысячелистника в основном происходило в сторону нижней границы, например, по высоте и массе куста. Тем не менее, среди регенерантов были выделены образцы, превышающие исходные формы по некоторым показателям. Например, выявлены регенеранты *A. millefolium*, которые по МДЭМ превосходили исходный образец №11 на 14-50%, а у *A. filipendulina* два регенеранта с МДЭМ до 0,3-0,4 %, что в 2-5 раз выше, чем у исходного образца №51. Выделенные перспективные формы рекомендованы для дальнейшего включения в селекционный процесс.

**Таблица 9.4 Варьирование некоторых хозяйственно ценных признаков у регенерантов, полученных из каллусов *A. millefolium***

Признак	Год	<i>A. millefolium</i> №11 $X \pm S_x$	Регенеранты	
			$X \pm S_x$	Lim
Высота растения, см	2009	56,7±5,7	45,3±6,4	20,2 – 80,3
	2010	53,4±1,7	26,8±0,9	20,0 – 33,5
Диаметр куста, см	2009	45,4±4,7	50,9±7,2	19,8 – 99,5
	2010	51,2±2,7	22,9±0,9	18,3 – 30,2
Урожай зеленой массы, г/растения	2009	370,1±16,1	221,2±13,8	119,2 – 700,4
	2010	201,2±5,1	147,4±7,9	99,7 – 189,8
Количество побегов, шт.	2009	28,5±5,1	17,8±5,6	5,0 – 48,2
	2010	21,5±0,9	14,4±0,9	9,2 – 23,4
МДЭМ на сырой вес, %	2009	0,10±0,01	0,10±0,02	0,05– 0,15
	2010	0,14±0,02	0,13±0,02	0,07– 0,16

\*Растения выращивались на экспериментальном участке НИИСХ Крыма (пос. Крымская Роза Белогорского района).

На основе исследований разработана биотехнологическая схема получения и микроразмножения регенерантов тысячелистника (см. рис. 7.9). Индукция побегов непосредственно из эксплантов может быть применена скорее для ускоренного размножения ценных образцов. Непрямой морфогенез из пассируемого каллуса, учитывая выявленную вариабельность некоторых хозяйственных признаков регенерантов, можно использовать при создании нового исходного материала для селекции.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время перед селекцией и семеноводством растений, в том числе и эфиромасличных, стоят сложные задачи, обусловленные глобальными изменениями климата, интенсификацией растениеводства, высокими требованиями к качеству продукции и рентабельности производства. Решение этих задач невозможно без привлечения современных методов биотехнологии, которые показали высокую эффективность при создании новых генотипов и ускоренном размножении многих сельскохозяйственных и декоративных культур [90, 99, 134, 155, 179, 219, 224, 420, 463, 480, 505, 519]. Для большинства эфиромасличных растений методы клеточной инженерии пока не получили значимого распространения в селекции и семеноводстве. Это связано со слабой изученностью биологии культивируемых тканей и органов и основных лимитирующих их развитие факторов, недостаточной проработкой методик регенерации растений *in vitro*, а также отсутствием разработок по многим клеточным биотехнологиям. Для основных возделываемых в России эфиромасличных видов и сортов данные об исследованиях такого рода крайне ограничены, поэтому в ходе экспериментальной работы мы попытались восполнить этот пробел и решить некоторые проблемы для создания эффективных биотехнологических систем.

Основой многих биотехнологий, направленных на создание новых форм, ускоренное размножение, синтез вторичных метаболитов *in vitro*, является культура каллусных тканей. Как показали проведенные исследования, индукция каллусогенеза возможна у всех изученных типов эксплантов, однако частота этого процесса значительно варьировала, в зависимости от используемого органа и генотипа. Максимальная частота образования каллуса (до 90-100%) у лаванды и тысячелистника была при эксплантации листьев, у фенхеля, аниса – сегментов стебля, у герани – сегментов черешка и стебля. Высокую эффективность показало применение полученных *in vitro* проростков. У кориандра при анализе 11 типов эксплантов максимальная частота каллусогенеза отмечена у сегментов гипокотыля (до 100%), а у шалфея все изученные экспланты из проростков (гипокотиль, лист, семядоля, корешок, почка и стебель) продемонстрировали высокую каллусообразующую способность (до 84-100%). Данные факты связаны с ювенильным состоянием органов проростков, а также их

культивированием на средах с регуляторами роста, что могло повлиять на уровень эндогенных гормонов, играющих важную роль в процессах дифференциации клеток [26, 107, 185, 210, 392].

Для всех изученных эфиромасличных растений установлено влияние на индукцию каллусогенеза вида, сорта и сортообразца. Особенно ярко это проявилось у розы – при анализе 11 генотипов частота формирования каллуса изменялась от 0 до 85%, что могло быть обусловлено гибридным происхождением этих сортов. Что касается гормонального состава питательных сред для каллусогенеза, то у большинства изученных видов (лаванда, шалфей, тысячелистник, кориандр) оптимальным для получения и пассирования каллуса было сочетание НУК (1-2 мг/л) и БАП (0,5 мг/л). Хотя у фенхеля и аниса лучшие результаты выявлены при использовании 2,4-Д и БАП (0,5-1,0 мг/л), а у герани – 2,4,5-Т и кинетина. Помимо этих факторов, на примере лаванды продемонстрировано влияние на образование и пассирование каллуса сезона введения *in vitro*, ориентации экспланта на питательной среде, массы трансплантов и их количества в культуральном сосуде.

Разработанные методики получения каллусных культур обеспечивали длительное культивирование каллуса, в частности, у розы и лаванды, как минимум, 5 лет. Ростовые индексы каллуса в значительной степени зависели от вида растения. Наибольшей пролиферативной активностью отличались каллусные культуры аниса (РИ до 43,3) и лаванды (РИ до 24,0). У других видов этот показатель был гораздо ниже: у кориандра – до 15, шалфея – до 10-12, у тысячелистника – до 6,6, а у фенхеля – всего до 3,8. У всех изученных видов РИ варьировали, в зависимости от сорта, однако у розы это проявилось наиболее ярко. Так, у сортов Мичуринка и Крымская красная РИ были соответственно 18,2 и 16,4, а у 'Белой' – только 3,4.

Для понимания закономерностей изменения популяции соматических клеток *in vitro*, а также при решении некоторых методических вопросов при разработке клеточных технологий важно изучение динамики цитофизиологических параметров популяции культивируемых каллусных клеток в цикле выращивания. У изученных эфиромасличных растений отмечен ряд видовых особенностей, касающихся продолжительности фаз ростового цикла. Самая короткая латентная фаза выявлена у аниса (1-2 сут) и лаванды (2-3 сут). Для герани, кориандра и розы установлена средняя продолжительность этой фазы (6-8 сут), а у фенхеля – максимальная (12-14 сут). Виды с

наибольшим ростовым индексом (анис и лаванда) характеризовались более быстрым вступлением в фазу роста, а у фенхеля, имеющего самый низкий РИ, лаг-фаза наиболее продолжительна, что связано со слабой пролиферацией каллусных тканей. Отмечены отличия и в структуре клеточных популяций, в частности, наименьшее количество гигантских клеток выявлено у розы (до 10%), что, по-видимому, и обусловило наибольшую плотность каллуса, достигающую 11272 кл./мг. В то же время в каллусе герани, содержащем наибольшее количество гигантских и удлинённых клеток (до 42%), выявлена минимальная плотность – 2647 кл./мг. Стационарная фаза роста рано наступала у лаванды (26-30-е сут), у герани, кориандра, аниса и розы несколько позже (40-45-е сут), а у фенхеля – только на 45-50-е сутки культивирования. Выявленные особенности позволили обосновать оптимальную для каждого вида длительность цикла выращивания, а также определить подходящий период для обработки каллусов мутагеном или стрессовыми факторами при клеточной селекции, который приходился на линейную фазу роста, характеризующуюся наибольшей ростовой активностью.

Эфиромасличные растения представляют значительную ценность, благодаря синтезу эфирных масел и других биологически активных веществ. Поэтому нельзя оставить без внимания это интересное направление исследований, которое является основой не только разработки альтернативных биотехнологий получения некоторых продуктов, но и широко используется как удобная модель для изучения биосинтеза вторичных метаболитов. На примере розы и лаванды продемонстрирована способность каллусных культур к синтезу эфирного масла и пигментов. Установлено, что в каллусах розы, полученных из лепестков цветка, накапливался красный пигмент, образование которого зависело от генотипа, длительности культивирования и штамма. Максимальное накопление пигмента наблюдали на стационарной фазе цикла выращивания, причем количество окрашенных штаммов возрастало к 3-5-му пассажам, а затем снижалось. У лаванды выделены штаммы, характеризующиеся способностью синтезировать голубой пигмент, не характерный для эксплантов листьев. В отличие от розы, этот пигмент накапливался в межклеточном пространстве вокруг агрегатов паренхимных клеток. В суспензионной культуре максимальное накопление пигмента наблюдали на линейной фазе роста. Эффективным приемом, позволившим отбирать продуктивные линии, явился плейтинг суспензионных культур на агаризованную среду и последующий

скрининг продуктивных клеточных линий.

Значительный интерес и сложность представляет изучение биосинтеза эфирного масла *in vitro*, поскольку у растений оно обычно накапливается в специализированных экскреторныхместилищах, и, кроме того, является многокомпонентным продуктом. В этом плане роза очень удачный объект не только из-за высокой стоимости эфирного масла, но и в связи с тем, что его биосинтез проходит в обычных клетках эпидермиса и мезофилла лепестков цветка. В каллусах из лепестков у всех изученных сортов синтезировались отдельные компоненты эфирного масла, при этом содержание экстрактивного масла было на 1-2 порядка ниже, чем в цветках. Состав экстрагируемых ароматических компонентов из каллусов отличался от эфирного масла из цветков розы – у большинства штаммов доминировали линалилацетат (до 50-64%) и линалоол (до 20-35%). Хотя были получены штаммы, у которых соотношение компонентов эфирного масла было близко к розовому маслу из растения. Максимальное накопление компонентов масла приходилось на стационарную фазу цикла выращивания, что соответствует характерной для многих видов растений разобщенности во времени процессов роста в популяции клеток и биосинтеза вторичных метаболитов. Выявлено влияние на накопление экстрактивного масла в каллусе пассажа и штамма, что позволило проводить отбор более продуктивных культур. По-видимому, в каллусной культуре розы на интенсивность накопления и качественный состав эфирного масла в большей мере влияли штаммовые, чем сортовые различия, поскольку у высоко- и низкомасличных сортов обнаружены штаммы как с высоким, так и низким его содержанием. Установленные закономерности представляют не только теоретический интерес, но и могут использоваться при создании биотехнологий получения красителей и компонентов эфирного масла *in vitro*.

Наиболее сложной проблемой при разработке клеточных технологий у многих видов растений является индукция морфогенеза *in vitro*. Способность изолированных культур к органогенезу или соматическому эмбриогенезу определяется многими факторами, среди которых важнейшую роль играют генотип и состав питательной среды. В данной работе для ряда генотипов и эксплантов эфиромасличных растений продемонстрирована возможность прямого или непрямого морфогенеза и получения регенерантов *in vitro*. Тип морфогенеза в значительной степени зависел от вида растения – у кориандра и фенхеля

в каллусной культуре выявлен соматический эмбриогенез, у аниса и тысячелистника – органогенез, а у шалфея, герани и лаванды в каллусах одновременно развивались органогенные структуры и эмбриоиды. Для некоторых видов подобраны условия регенерации побегов непосредственно из тканей экспланта: у герани – из сегментов стебля, черешка, листа, у аниса – из семян, черешка и стебля, у тысячелистника – из листьев.

У изученных эфиромасличных растений установлены закономерности влияния на индукцию морфогенеза в каллусных культурах генотипа исходного растения, состава питательной среды, типа экспланта и пассажа. При этом выявлено большое разнообразие состава и концентраций гормонов в питательной среде для стимуляции морфогенеза. В каллусах лаванды, герани и шалфея побегообразование достигалось при введении в среду цитокинина (0,5-1,0 мг/л БАП или Кин). У тысячелистника лучшие результаты получены при использовании БАП или Кин и ГК<sub>3</sub>. В каллусе аниса наибольшая частота морфогенеза наблюдалась в присутствии НУК и БАП (0,5-1,0 мг/л), хотя прямой органогенез из стебля проходил на безгормональной среде, что может указывать на необходимый уровень эндогенных гормонов в тканях этого вида. Для индукции соматического эмбриогенеза, по данным ряда авторов, необходимо присутствие в питательной среде 2,4-Д [90, 112, 166, 407, 503, 554]. В нашей работе аналогичный факт отмечен только у кориандра при получении эмбриогенного каллуса из соцветий, который с наибольшей частотой формировался на среде с 2,4-Д и БАП. Однако в каллусе из органов проростков у этого вида образование зародышей было максимальным при добавлении одного БАП, что свидетельствует о важной роли эпигенетической характеристики экспланта, включающей и уровень эндогенных гормонов.

При разработке методик регенерации *in vitro* важно использование широкого спектра эксплантов, что позволяет не только вводить материал в культуру круглый год (из проростков *in vitro*), но и повысить в ряде случаев частоту и длительность морфогенеза. Помимо этого возможность индукции морфогенеза из различных органов может способствовать разработке различных клеточных технологий, так как тип экспланта, по некоторым данным, влияет на проявление соматической изменчивости у регенерантов [57, 191, 309], эффективность мутагенеза [473] и клеточной селекции [120]. В этом плане наиболее отзывчивой на условия культивирования оказалась

герань, у которой все проанализированные типы эксплантов (лист, стебель, черешок, цветок) формировали способный к морфогенезу каллус с достаточно высокой частотой (от 56% у листа до 100% у стебля). У тысячелистника непрямой морфогенез индуцировался только при использовании сегментов листа, у лаванды – листа и почки, а у аниса – участков стебля. У некоторых эфиромасличных растений использовали как экспланты взрослых растений, так и пробирочных, при этом частота морфогенеза в каллусе из ювенильных органов проростков часто была выше. Так, у фенхеля в каллусе из стебля растения и гипокотили проростка частота соматического эмбриогенеза достигала соответственно 59,6 и 97,8%. У шалфея в каллусах из сегментов листа растения не удалось индуцировать морфогенез, а из микрочеренков пробирочных растений наблюдали побегообразование. В то же время у кориандра эмбриогенный каллус получен из соцветий и завязей растений с большей частотой (до 62,8%), чем из листа, гипокотили и почки проростков *in vitro* (до 27%).

Многие клеточные технологии связаны с длительным культивированием каллусов, при котором важно поддержание их морфогенного потенциала. Поэтому при разработке методик регенерации из каллусных культур большое значение имеет длительность сохранения их способности к индукции морфогенеза. Регенерация растений в каллусе у большинства видов (лаванда, кориандр, фенхель, анис, тысячелистник) ограничена 3-5 пассажами, за исключением герани, у которой морфогенез наблюдали в течение 2-3 лет. У шалфея индукцию побегов в каллусе наблюдали вплоть до 6-10-го пассажа. При дальнейшем культивировании частота морфогенеза обычно снижалась. Однако у некоторых видов (лаванда, кориандр, тысячелистник) при выделении морфогенных штаммов можно было продлить их способности к регенерации до 2-3 лет.

Важную роль в индукции морфогенеза в каллусных культурах играет генотип растения, и для всех изученных видов показана значительная вариабельность частоты органогенеза или соматического эмбриогенеза в зависимости от сорта или образца. У перекрестно опыляемых видов (шалфея, фенхеля, аниса), помимо этого, выявлена значительная изменчивость частоты морфогенеза у индивидуальных растений в пределах сорта. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности проведения отбора растений с повышенной морфогенетической способностью у этих видов для повышения их

регенерационного потенциала. Для фенхеля, тысячелистника, лаванды и аниса установлена эффективность применения полученных из каллусов регенерантов в качестве донорных растений с целью повышения морфогенетического потенциала.

На примере фенхеля показана возможность повышения частоты и длительности морфогенеза (до 16-го пассажа) в культивируемых каллусах при изменении гормонального состава морфогенной среды. Это может косвенно свидетельствовать об изменении уровня эндогенных гормонов при пассировании каллусов фенхеля в течение 1,5-2 лет, что обуславливает необходимость модификации состава питательной среды.

На основании полученных данных для повышения морфогенного потенциала каллусов можно рекомендовать отбор морфогенных штаммов, использование в качестве донорных растений регенерантов, проведение отбора в пределах сортовых популяций, смену гормонального состава питательной среды при длительном пассировании.

Одной из достаточно эффективных клеточных технологий создания генетического разнообразия является получение соматоклональных вариантов. Разработанные методики регенерации позволяют получать растения из каллусов разных эксплантов, генотипов и пассажей, что очень важно для индукции генетической изменчивости. Почти у всех изученных эфиромасличных видов показано наличие соматоклональной вариабельности. Наименьшей изменчивостью характеризовались регенеранты тысячелистника и фенхеля, которые по морфологии не отличались от исходных образцов. Для кориандра отмечена значительная вариабельность семенного потомства регенерантов по морфологии, фертильности и хозяйственно ценным признакам. При анализе вегетативного потомства регенерантов лаванды выявлено до 24,1% форм с морфологическими изменениями, а также вариабельность по сравнению с исходными сортами по некоторым количественным признакам. Размах изменчивости значений многих признаков у регенерантов был гораздо больше, и коэффициенты вариации почти в 2 раза выше, чем у сортов. Изучение семенного потомства регенерантов шалфея позволило обнаружить до 12,5% образцов с отклонениями по морфологии и срокам цветения по сравнению с исходным сортом. По всем признакам размах изменчивости у регенерантов значительно превосходил внутрисортную изменчивость, при этом наблюдали сдвиг популяции регенерантов как в сторону нижней, так и верхней границ значений показателя.

Некоторые особенности соматональной вариабельности более детально изучены на примере регенерантов герани, которые отличались наибольшей морфологической изменчивостью, доходящей до 56,2% в отдельных вариантах опытов. Среди полученных из каллусов растений отмечено появление до 39% анеуплоидов и большая вариабельность по хозяйственно ценным признакам. В отличие от других изученных видов, у герани была выявлена значительная изменчивость регенерантов по содержанию некоторых компонентов эфирного масла, что свидетельствует о возможности использования соматоклонов для получения форм с измененным составом эфирного масла. Изменение признаков, как и у других эфиромасличных культур, происходило как в сторону их ухудшения, так и в сторону повышения значений. Показано, что у одного регенеранта герани могли быть измененными сразу несколько признаков (урожайность, фертильность, морфология растения), что привлекательно для селекции. Частота встречаемости морфологически измененных форм у герани зависела от длительности культивирования каллуса (возрастала по мере пассирования) и типа экспланта (была выше у черешка, чем листа и стебля). Спектр измененных признаков был примерно одинаков у регенерантов, полученных при использовании разных эксплантов и сортов. Лучшие по хозяйственно полезным признакам регенеранты были индуцированы из каллусов 1-3-го пассажей, а из длительно культивируемых каллусов получено больше регенерантов с морфологическими изменениями. Растения, полученные из каллусов, культивируемых более 9-12 пассажей, у герани, также как и у других изученных видов, часто характеризовались слабой приживаемостью и угнетенным ростом. Поэтому получение из таких культур соматоклонов, по-видимому, нецелесообразно из-за низкой вероятности появления ценных для селекции образцов.

Существенно увеличить частоту вариаций *in vitro*, а в некоторых случаях и расширить спектр изменчивости позволяет мутагенез. В качестве мутагенного фактора в питательную среду вводили колхицин. У лаванды и герани установлены особенности действия колхицина на каллусные культуры, подобраны сублетальные дозы обработки и показано преимущество использования морфогенных каллусов, которые проявили большую устойчивость к обработке, лучше отрастали и сохраняли регенерационную способность. Однако после обработки колхицином значительно снижалась частота морфогенеза, часто

формировались мало жизнеспособные проростки. Анализ регенерантов герани, полученных на средах с колхицином, показал повышение числа морфологически измененных форм и анеуплоидов по сравнению с контролем. Типы измененных признаков у регенерантов в контроле и после различных вариантов мутагенеза были схожи. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования колхицина для обработки каллусных культур у эфиромасличных растений в качестве самостоятельного методического приема, позволяющего получить новые генотипы для селекции.

Методы клеточной селекции, в отличие от индукции соматклонов, позволяют проводить направленный отбор генотипов с заданными свойствами, что более привлекательно для получения исходного материала, устойчивого к неблагоприятным факторам среды. В результате исследований для лаванды, кориандра, шалфея и герани разработаны селективные системы отбора форм, устойчивых к осмотическому и низкотемпературному стрессам. Проведена оптимизация объектов (каллусы или эмбриокультуры) и схем селекции *in vitro*, селективного фактора, его сублетальных доз и длительности действия, питательных сред и условий для регенерации растений из устойчивых линий. На примере герани и лаванды показано, что эффективным подходом в селекции на устойчивость к осмотическому, солевому и низкотемпературному стрессам было использование морфогенных каллусов, у которых выше сублетальная доза стрессового фактора, а также сохранялась регенерационная способность после снятия стрессовой нагрузки. У лаванды при изучении действия NaCl и низкой отрицательной температуры установлено преимущество использования для клеточной селекции каллусов 4-го пассажа, по сравнению с первым, а также его предварительной обработки колхицином, что могло быть обусловлено увеличением изменчивости культивируемых клеток. У кориандра при сравнении двух биотехнологических объектов отмечена большая устойчивость к холодному стрессу у эмбриокультур, чем у каллусов. Установленная корреляция между полевой зимостойкостью изученных генотипов и основными показателями развития эмбриокультур свидетельствует о возможности отбора *in vitro* форм, устойчивых к действию низкой температуры. Для шалфея также выявлена связь между засухоустойчивостью сортов и основными показателями развития зиготических зародышей на средах с осмотиками, что позволило разработать селективную систему для скрининга

устойчивых форм.

Важным направлением биотехнологии эфиромасличных растений является клональное микроразмножение, которое, благодаря многочисленным преимуществам по сравнению с традиционными методами, может использоваться в селекции и семеноводстве. Весьма перспективным является применение микроразмножения в комплексе с клеточными технологиями, способствующими расширению генетического разнообразия, что позволяет быстрее размножить и оценить полученные *in vitro* регенеранты, включить их в селекционную работу и в целом повысить эффективность таких биотехнологических систем. Полученные данные свидетельствуют о возможности индукции морфогенеза из каллусов, однако, такой метод, успешно используемый при размножении некоторых видов растений, по-видимому, не подходит для изученных нами эфиромасличных растений из-за выявленной соматоклональной изменчивости. Разработанные методики индукции прямого морфогенеза у герани, аниса, тысячелистника могут быть использованы для целей микроразмножения при контроле генетической стабильности полученных растений. Более целесообразным приемом является индукция развития уже существующих на растении меристем. В качестве эксплантов использовались пазушные и верхушечные почки растений или микрочеренки пробирочных растений. Для сортов и образцов лаванды, герани, шалфея, фенхеля и тысячелистника выявлены особенности морфогенеза изолированных меристем и оптимизированы условия для всех этапов размножения *in vitro*. На первом, и особенно, втором этапах у всех генотипов наблюдали формирование не только основного, но и адвентивных побегов, поэтому для размножения *in vitro* применяли несколько методов – микрочеренкования побегов и индукции адвентивного побегообразования. У тысячелистника и герани можно использовать только дополнительные побеги, при этом коэффициент размножения у этих видов не превышал 6-8 за субкультивирование. У лаванды формировалось большое число адвентивных побегов, и при использовании двух методов коэффициент размножения достигал в некоторых пассажах 32-40. У фенхеля и шалфея развивалось не более 2-3 побегов, поэтому даже при использовании двух методов коэффициенты размножения не превышали 8-9.

Показано влияние на развитие меристемных культур генотипа, сезона, расположения экспланта на растении, состава питательной среды и количества субкультивирований. Важнейшим фактором,

определяющим развитие меристем *in vitro*, был состав питательной среды, при этом на этапах размножения эффективно введение кинетина или БАП и ГК<sub>3</sub>, а при укоренении – ИМК или НУК. Для всех изученных видов растений показано влияние длительности культивирования на эффективность размножения. У шалфея и фенхеля максимальный коэффициент размножения отмечен в первых трех субкультивированиях, а затем наблюдалось его снижение. У лаванды выявлена другая закономерность – в течение первых 3-х пассажей происходило повышение коэффициента размножения, затем его постепенное снижение, а после 7-го пассажа – стабилизация этого показателя.

Экспериментальные данные послужили методической основой для разработки систем создания новых форм и размножения эфиромасличных растений *in vitro*, включающих различные клеточные технологии, которые в обобщенном виде представлены на рисунке 9.6. Прежде всего, это получение соматоклональных вариантов, базирующиеся на индукции морфогенеза в каллусах из различных типов эксплантов. Предлагаемые схемы включают также клеточную селекцию, позволяющую создавать формы с повышенной устойчивостью к низкотемпературному и осмотическому стрессу. Для розы эфиромасличной целесообразно при получении гибридов использование метода эмбриокультуры, особенно в сочетании с микроразмножением. В качестве заключительного этапа у всех видов используется клональное микроразмножение, которое позволяет быстро размножить растения-регенеранты, но может использоваться и как самостоятельный метод клонирования ценных образцов и сортов. Разработанные приемы были практически реализованы в НИИСХ «Крыма» при создании исходного селекционного материала, в ходе анализа которого выделены перспективные образцы, превосходящие исходные сорта по хозяйственно ценным признакам, а также создан сорт шалфея мускатного Селинж.



## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алимгазинова Б.Ш., Рахимов К.Д. Использование культуры тканей в микроразмножении лаванды // Нетрадиционное растениеводство, экология и здоровье: труды VIII межд. симп. Симферополь, 1999. С. 345.
2. Аль-Холани Х.А.М. Получение стресс-толерантных растений кукурузы методом клеточной селекции: автореф. дисс. на соискание уч. степени канд. биол. наук: спец. 03.01.05 «Физиология и биохимия растений». М., 2010. 24 с.
3. Амброс Е.В. Получение межродовых гибридов *Fragaria ananassa* × *Potentilla nepalensis* методом эмбриокультуры // Бюллетень ГНБС. 2013. №107. С. 39–46.
4. Антонова Т.С., Краснянский С.Ф., Чемостникова Т.А., Зозуль Т.Г. Соматический эмбриогенез в каллусе из семядолей незрелых зародышей подсолнечника // Докл. ВАСХНИЛ. 1991. № 4. С. 9–13.
5. Асадова С.Ш., Азизов И.В., Карагезов Т.Г. Сахароза как морфогенетический и осмопротекторный фактор в культуре клеток люцерны // Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений: 3-я Междунар. науч. конф., Минск, 14-16 мая 2008 г.: сб. науч. тр. Минск: Изд. Центр БГУ, 2008. С. 209–211.
6. Асланянц Л.К., Маршавина З.В., Казарян А.Г. Продуктивность культуры клеток *Iris sibirica* L., выращенных на упрощенной среде // Растительные ресурсы. 1988. Вып. 4. С. 107–110.
7. Атлас лекарственных растений России / под общ. ред. Быкова В.А. М.: ОАО «Щербинская типография», 2006. 351 с.
8. Аш О.А., Кузнецова О.И., Хартина Г.А., Гостимский С.А. Изучение регенерации растений из длительно культивируемого каллуса // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: .8-я междунар. конф., Саратов, 9-13 сент. 2003 г.: тезисы докл. Саратов: Изд-во Саратовской губернской торгово-промышленной палаты, 2003. С. 30–31.
9. Бабаева С.А., Петрова Т.Ф., Гапоненко А.К. Цитогенетика культивируемых *in vitro* соматических клеток и растений-регенерантов *Triticum durum* Desf. // Цитология и генетика. 1994. Т. 28, № 4. С. 23–30.
10. Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько И.И. Регенерація рослин із різних типів експлантів м'якої пшениці // Физиология и биохимия культ. растений. 2008. Т. 40, № 2. С. 150–156.
11. Багрова А.М., Ежова Т.А., Хартина Г.А., Гостимский С.А. Получение длительно культивируемых морфогенных каллусов и анализ соматической изменчивости у регенерантов зерновых и овощных сортов гороха // Вест. Моск. Ун-та. Сер. Биология. 1991. Т. 16, № 1. С. 28–33.
12. Банникова В.П., Моргун В.В., Майстров П.Д., Барабанова Е.А., Логвиненко В.Ф., Карпец А.И. Влияние нитрозометилмочевины на процессы каллусообразования и регенерации в культивируемых *in vitro* зародышках пшеницы // Цитология и генетика. 1990. Т. 24, № 6. С. 31–35.
13. Белокурова В.Б. Использование соматического эмбриогенеза и мутагенеза для получения генетически измененных форм винограда: автореф. дисс. на соискание уч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.25 «Гистология,

цитология, клеточная биология». К., 1997. 162 с.

14. Белянская С.Л., Шамина З.Б., Кучеренко Л.А. Морфогенез в клонах риса, резистентных к стрессовым факторам // Физиология раст. 1994. Т. 41, № 4. С. 573–577.

15. Загоскина Н.В., Назаренко Л.В., Калашникова Е.А., Живухина Е.А. Биотехнология: теория и практика. М.: Изд-во Оникс, 2009. 496 с.

16. Бишимбаева Н.К. Сомакциональная вариабельность как источник получения новых форм пшеницы с ценными признаками // Experimental Biology. 2015. [S.l.]. Vol. 55, No. 3. P. 41–46.

17. Бондаренко А.М. Клеточные технологии и сомакциональная изменчивость в селекции пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений. 1996. Т. 28, № 3. С. 183–194.

18. Бородина В.М., Сондоре О.Ю., Зеленин А.В. Использование антибиотика оливомидина для цитохимического изучения хроматина // Цитология. 1979. Т. 21, № 9. С. 1036–1040.

19. Бородулина И.Д., Вечернина Н.А., Таварткиладзе О.К. Каллусогенез и регенерационная способность листовых эксплантов *Primula polyantha* Mill. // Известия Алтайского гос. университета. 1998. № 4 (10). С. 145–147.

20. Бостанова Л.У. Разработка и оптимизация биотехнологических методов культивирования *in vitro Lavandula angustifolia* Mill. с целью расширения исходного материала для селекции: автореф. дисс. на соискание уч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.23 «Биотехнология». Ставрополь, 2006. 22 с.

21. Бочкарев Н.И., Зеленцов С.В. Современное состояние таксономии, морфологии и селекции лаванды // Масличные культуры. 2013. Вып. 2 (155–156). С. 163–178.

22. Бугара А.М. Клеточная дифференциация и экспериментальный морфогенез у эфиромасличных растений: автореф. дисс. на соискание уч. степени докт. биол. наук: спец. 03.00.05 «Ботаника». Кишинев, 1992. 43 с.

23. Бугара И.А. Клональное микроразмножение и оздоровление *Mentha piperita* L. *in vitro* // Ученые записки ТНУ им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». 2013. Т. 26 (65), №1. С. 10–15.

24. Бугара И.А., Юнусова Э.А. Клеточная селекция каллусных культур *Glycine max* на устойчивость к осмотическому стрессу // Экосистемы. 2016. Вып. 8. С. 83–87.

25. Бугара И.А. Индуцированный морфогенез и клональное микроразмножение перспективных сортов мяты: автореф. дисс. на соискание уч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.20 «Биотехнология». Ялта, 2007. 20 с.

26. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учебное пособие. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.

27. Вайновская И.Ф., Чумакова И.М. Особенности адаптации растений герберы (*Gerbera Jamesonii* Bolus) к условиям *ex vitro* // Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений: 3-я Междунар. науч. конф., Минск 14-16 мая 2008 г.: сб. науч. тр. Минск: Изд. Центр БГУ, 2008. С. С. 217–221.

28. Вечернина Н.А., Таварткиладзе О.К., Жаркова С.В. Каллусогенез и

регенерационная способность тканей и органов *Allium cepa* L. *in vitro* // Известия Алтайского госуниверситета. 2000. № 3 (17). С. 69–71.

29. Вечернина Н.А. Сохранение биологического разнообразия редких, исчезающих видов, уникальных форм и сортов растений методами биотехнологии: автореф. дисс. на соискание уч. степени докт. биол. наук: спец. 03.00.05, 03.00.12 «Физиология и биохимия растений». Барнаул, 2006. 38 с.

30. Волощук С.І. Клітинна селекція пшениці на стійкість до *Fusarium graminearum* Schwabe.: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с.-г. наук: спец. 03.00.15 «Генетика». Київ, 2006. 20 с.

31. Высоцкий В.А. Клональное микроразмножение растений // Культура клеток растений и биотехнология. М.: Наука, 1986. С. 91–102.

32. Высоцкий В.А., Упадышев М.Т. Морфозы при клональном микроразмножении *Rubus occidentalis* и *Rubus fruticosus* (Rosaceae) // Бот. журн. – 1992. Т. 77, № 7. С. 85–91.

33. Галеева Е.И., Максютובה Н.Н., Румянцев Н.И. Состав белков каллусов гречихи татарской *Fagopirum tataricum* с различным морфогенным потенциалом // Цитология. 2001. Т. 43, № 4. С. 332–336.

34. Герасимова С.И. Клеточная селекция картофеля на устойчивость к осмотическому стрессу // Использование клеточных технологий в селекции картофеля. Научные труды НИИ картофельного хозяйства. М., 1987. С. 50–52.

35. Герасимова С.И. Организация и первые результаты клеточной селекции картофеля на устойчивость к пониженным температурам // Использование клеточных технологий в селекции картофеля. Научные труды НИИ картофельного хозяйства. М., 1987. С. 46–50.

36. Геринг Х. Преодоление витрификации и улучшение акклиматизации растений при микроклональном размножении // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. М.: Наука, 1991. С. 197–200.

37. Гірко В.С. Нетрадиційні методи створення селекційного матеріалу пшениці: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня докт. с.-г. наук: спец. 06.01.05 «Селекція та насінництво». – Київ, 1999. – 34 с.

38. Гладков Е.А. Получение растений полевиской побегоносной, обладающей повышенной устойчивостью к кадмию // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: IX междунар. конф., Звенигород, 8-12 сент. 2008 г.: тезисы докл. М.: ИД ФБК-ПРЕСС, 2008. С. 90–91.

39. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Том 1. Сорты растений (по состоянию на 12 марта 2020 г.). [Электронный ресурс]. URL: [https://gossortrf.ru/wpcontent/uploads/2020/03/FIN\\_reestr\\_dop\\_12\\_03\\_2020.pdf](https://gossortrf.ru/wpcontent/uploads/2020/03/FIN_reestr_dop_12_03_2020.pdf).

40. Грати М.И., Уралец Л.И., Андрущенко В.К. и др. Соматическая изменчивость *in vitro* сортов и гибридов томата // Цитология и генетика. 1997. Т. 31, № 5. С. 32–37.

41. Губанова Н.Я., Дубровная О.В., Чугункова Т.В. Комплексная селекция *in vitro* на устойчивость клеточных линий кормовой свеклы к токсину возбудителя бактериоза и низким температурам // Биополимеры и клетка. 2000. Т. 16, № 2. С. 138–144.

42. Гумерова Е.А., Галеева Е.И., Чуенкова С.А., Румянцев Н.И. Соматический эмбриогенез и геммогенез в культуре тканей гипокотилей

*Fagopyrum esculentum* // Физиология раст. 2003. Т. 50, № 5. С. 716–721.

43. Давоян Э.И. Генетическая детерминированность процессов каллусообразования и индукции регенерантов в культуре ткани риса // Генетика. 1987. Т. 23, № 2. С. 303–310.

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

45. Дитченко Т.И. Влияние условий освещения на рост и содержание флавоноидов в каллусой культуре шалфея лекарственного. 2010. [Электронный ресурс]. URL: <http://shmain.ru/nauchnye-stati/vliyanie-usloviy-osveshheniya-na-rost-i-soderzhanie-flavonoidov-v-kallusnoj-kulture-shalfeya-lekarstvennogo.html>.

46. Джонс О.П. Размножение хозяйственно важных древесных растений *in vitro* // Биотехнология сельскохозяйственных растений. М.: Агропромиздат, 1987. С. 134–152.

47. Долгих Ю.И. Соматональная изменчивость растений и возможности ее практического использования (на примере кукурузы): автореф. дисс. на соискание уч. степени докт. биол. наук: спец. 03.00.12 «Физиология и биохимия растений». М., 2005. 35 с.

48. Дридзе И.Л. Использование аналога пролина для отбора стрессоустойчивых вариантов в культуре ткани сои и табака: автореф. дисс. на соискание уч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.20 «Биотехнология». М., 1990. 24 с.

49. Дубровна О.В., Чугункова Т.В., Бавол А.В., Лялько І.І. Біотехнологічні та цитогенетичні основи створення рослин, стійких до стресів. К.:Логос, 2012. 428с.

50. Дьячук П.А., Носова Н.Н., Тучин С.В., Иванова Ю.Е. Особенности каллусообразования и регенерации растений в культуре соматических тканей яровых сортов мягкой и твердой пшеницы // Сельскохозяйственная биология 1990. № 3. С. 56–59.

51. Еаттатхоттам Д.Д. Клеточная селекция яровой пшеницы на устойчивость к стрессам: автореф. дисс. на соискание уч. степени канд. с/х наук: спец. 03.00.23 «Биотехнология». М., 1991. 19 с.

52. Евсеева Н.В., Ткаченко О.В., Лобачев Ю.В., Фадеева И.Ю., Щеголев С.Ю. Биохимическая оценка морфогенетического потенциала каллусных клеток пшеницы *in vitro* // Физиология раст. 2007. Т. 54, № 2. С. 306–311.

53. Егорова Н.А. Некоторые цитологические и физиолого-биохимические особенности развития микроспор и пыльцевых зерен кориандра *in situ* и *in vitro* в связи с индукцией андрогенных гаплоидов: автореф. дисс. на соискание уч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.05 „Ботаника”. Кишинев, 1984. 21 с.

54. Егорова Н.А., Бугара А.М., Ермилова А.М. Получение исходного материала для селекции эфиромасличной герани методами культуры тканей // Труды ИЭЛР. 1998. Т. 24. С. 98–110.

55. Егорова Н.А. Цитофизиологическая характеристика каллусных

культур некоторых эфиромасличных растений // Физиология и биохимия культ. растений. 2001. Т. 33, № 2. С. 159–164.

56. Егорова Н.А. Культура изолированных тканей тысячелистника *in vitro* // Экосистемы Крыма, их оптимизация и охрана: тематический сб. науч. трудов. Симферополь: Таврия, 2003. Вып. 13. С. 155–160.

57. Егорова Н.А., Глумова Н.В. Исследование культуры клеток лаванды в связи со способностью к образованию пигмента // Физиология и биохимия культ. растений. 2005. Т. 37, № 5. С. 429–435.

58. Егорова Н.А. Калусогенез и регенерация растений в культуре изолированных тканей кориандра // Физиология и биохимия культ. растений. 2008. Т. 40, № 2. С. 142–149.

59. Егорова Н.А. Получение растений-регенерантов в каллусной культуре лаванды и их микроразмножение *in vitro* (методические рекомендации). Симферополь: ИЭЛР УААН, 2008. 28 с.

60. Егорова Н.А., Ставцева И.В. Влияние длительности культивирования каллусных культур на индукцию морфогенеза у эфиромасличных растений // Физиология растений: проблемы та перспективи розвитку. К.: Логос, 2009. Т. 2. (5.15). С. 613–618.

61. Егорова Н.А., Ставцева И.В. Культура изолированных тканей и органов кориандра и ее использование в селекции: методические рекомендации. Симферополь: ИЭЛР НААН, 2011. 24 с.

62. Егорова Н.А. Влияние осмотического стресса на развитие каллусных культур лаванды *in vitro* // Бюллетень ГНБС. 2012. № 105. С. 139–143.

63. Егорова Н.А., Кривохатко А.Г., Ставцева И.В., Каменек Л.И. Микроразмножение эфиромасличных растений с использованием культуры изолированных тканей и органов *in vitro* // Таврійський вісник аграрної науки. 2013. № 1. С. 9–14.

64. Егорова Н.А. Некоторые аспекты биотехнологии эфиромасличных растений: индукция каллюсо- и морфогенеза, использование соматональной варибельности // Физиология растений и генетика. 2014. Т.46, №2. С. 108–120.

65. Егорова Н.А. Некоторые аспекты биотехнологии эфиромасличных растений: микроклональное размножение, синтез продуктов вторичного метаболизма *in vitro* // Физиология растений и генетика. 2014. Т.46, №3. С. 187–201.

66. Егорова Н.А., Ставцева И.В., Якимова О.В., Каменек Л.И. Кривохатко А.Г. Некоторые аспекты клонального микроразмножения и сохранения *in vitro* эфиромасличных растений // Таврический вестник аграрной науки. 2015. №1 (3). С. 18–24.

67. Егорова Н.А., Ставцева И.В. Разработка биотехнологических приемов микроразмножения *in vitro* для *Lavandula angustifolia* Mill. // Труды Кубанского государственного аграрного университета». 2015. №3(54). С. 138–142.

68. Егорова Н.А., Ставцева И.В. Микроразмножение сортов розы эфиромасличной в культуре *in vitro* // Вестник Удмуртского университета. Серия Биология. Науки о Земле. 2016. Т. 26, вып. 2. С. 45–52.

69. Егорова Н.А., Ставцева И.В., Митрофанова И.В. Влияние сорта и факторов культивирования *in vitro* на клональное микроразмножение розы эфиромасличной // Бюллетень ГНБС. 2016. Вып. 120. С. 36–43.

70. Егорова Н.А., Ставцева И.В. Разработка биотехнологических приемов получения устойчивых к низкотемпературному стрессу форм кориандра *in vitro* // Масличные культуры. 2016. Вып. 1 (165). С. 43–50.
71. Егорова Н.А. Изменчивость каллусных культур лаванды при длительном пассировании *in vitro* // Таврический вестник аграрной науки. 2017. №1 (9). С. 16–27.
72. Егорова Н.А., Ставцева И.В. Разработка селективной системы *in vitro* для получения каллусных линий лаванды, устойчивых к низкой температуре // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2017. №4 (67). С. 48–51.
73. Егорова Н.А., Ставцева И.В., Митрофанова И.В. Морфогенез в культуре меристем розы эфиромасличной при хемотерапии *in vitro* // Бюллетень ГНБС. 2017. Вып. 125. С. 65–72.
74. Егорова Н.А., Ставцева И.В., Митрофанова И.В. Влияние сорта и состава питательной среды на укоренение розы эфиромасличной при микроразмножении *in vitro* // Биомика. 2018. Т. 10, № 1. С.11–15.
75. Егорова Н.А., Якимова О.В. Влияние длительного субкультивирования на клональное микроразмножение *Melissa officinalis* L. и *Origanum vulgare* L. // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2019. № 47. С. 22–39.
76. Егорова Н.А., Митрофанова И.В., Браилко В.А., Гребенникова О.А., Палий А.Е., Ставцева И.В. Морфогенетические и физиолого-биохимические особенности *Lavandula angustifolia* при длительном микроразмножении *in vitro* // Физиология растений. 2019. Т. 66, № 2. С. 137–145.
77. Егорова Н.А., Ставцева И.В. Использование эмбриокультуры для отбора *in vitro* форм кориандра, устойчивых к низкотемпературному стрессу // Экобиотех. 2019. Т.2, № 3. С. 369–377.
78. Егорова Н.А. Оптимизация условий получения и характеристика суспензионной культуры лаванды // Таврический вестник аграрной науки. 2020. № 1 (21). С. 19–30.
79. Жук О.І. Формування адаптивної відповіді рослин на дефіцит води // Физиология и биохимия культ. растений. 2011. Т. 43, № 1. С. 26–37.
80. Журавлев Ю.Н., Омелько А.М. Морфогенез у растений *in vitro* // Физиология раст. 2008. Т. 55, № 5. С. 643–664.
81. Загорская М.С., Егорова Н.А., Абдурашитов С.Ф. Влияние длительного культивирования *in vitro* на морфометрические параметры и генетическую стабильность при микроразмножении мяты / Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки: материалы III Межд. науч. конф. (Ялта, 24-28 сентября 2018 г.). Симферополь: ИТ «Ариал», 2018. С. 66–67.
82. Зайцева Ю.Г., Амброс Е.В., Новикова Т.И. Укоренение и адаптация регенерантов морозоустойчивых представителей рода *Rhododendron* к условиям *ex vitro* // Turczaninowia. Т. 21, № 1. С. 144–152.
83. Здруйковская-Рихтер А.И. Эмбриокультура изолированных зародышей, генеративных структур и получение новых форм растений Ялта: Крым-Фарм-Трейддинг, 2003. 368 с.
84. Зеленіна Г.А. Морфогенез в культурі *in vitro* сегментів стебла і

клональне мікророзмноження *Arnica chamissonis* Less. ssp. *foliosa* (Nutt.) Maguire: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук: спец. 03.00.20 «Біотехнологія». Ялта, 2007. 20 с.

85. Зильберварг И.Р., Митрофанова И.В., Емец А.И., Митрофанова О.В., Работягов В.Д., Блюм Я.Б. Использование оризалина и амипрофосметила для эффективной полиплоидизации котовника (*Nepeta* sp.) // Доклады Национальной академии наук Украины. 2001. № 3. С. 169–175.

86. Зинатуллина А.Е. Цитофизиологические особенности контрастных типов каллусов *in vitro* // Успехи современной биологии. 2020. Т.140, № 2. С. 183–194.

87. Змушко А.А. Изучение морфологической изменчивости клоновых подвоев яблони на питательных средах с различной концентрацией фитогормонов // Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений: сб. науч. тр. 3-й Междунар. науч. конф., Минск, 14-16 мая 2008 г. Минск: Изд. Центр БГУ, 2008. С. 236–239.

88. Золотилова О.М., Золотилев В.А., Скипор О.Б., Ставцева И.В. Сравнительный анализ регенерантов фенхеля обыкновенного по основным морфо-биологическим и хозяйственно ценным признакам // Таврический вестник аграрной науки. 2017. №3 (11). С. 9–16.

89. Иващенко І.В., Положенець В.М. Отримання для селекції стійких до фузаріозної гнилі форм картоплі шляхом калусної культури // Физиология и биохимия культ. растений. 1997. Т. 29, № 5. С. 246–350.

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

91. Инюткина А.Г., Егорова Н.А. Индукция каллусогенеза, регенерация растений и микроразмножение полыни эстрагон в культуре *in vitro*: методические рекомендации. Симферополь: ИЭЛР НААН, 2011. 28 с.

92. Инюткина А.Г., Егорова Н.А. Введение в культуру *in vitro* изолированных меристем полыни эстрагон (*Artemisia dracuncululus* L.) // Известия Уфимского научного центра РАН. 2013. № 1. С. 65–69.

93. Исаков А.Р. Селекционная ценность растений ячменя, регенерированных из культуры соматических тканей // Проблемы теоретической и прикладной генетики в Казахстане: мат-лы респ. конф. Алма-Ата, 1990. С. 111–115.

94. Калашникова Е.А. Клеточная инженерия растений. М.: Юрайт, 2020. 333 с.

95. Калашникова Е.А., Гудь Л.А., Анисимов А.А., Киракосян Р.Н., Василев А., Тараканов И.Г. Влияние спектрального состава света на морфофизиологические показатели микрклонов малины и ежевики *in vitro* // Известия ТСХА. 2020. № 2. С. 54–63.

96. Калашникова Е.А., Швец Д.А., Навроцкая Э.В., Киракосян Р.Н. Применение аэропоники для адаптации плодово-ягодных культур к условиям *ex vitro* // Лесохоз. информ.: электронный сетевой журнал. 2020. № 2. С. 109–118.

97. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. К.: Наук. думка, 1980. 488 с.

98. Карначук Р.А., Бенсон Н.А., Трофимова Н.А., Двинянинова И.Б.

Клеточная культура серпухи венценосной как перспективный продуцент фитостероидов // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. М.: Наука, 1991. С. 39–41.

99. Картель Н.А., Кильчевский А.В. Биотехнология в растениеводстве. Минск: Тэхналогія, 2005. 310 с.

100. Киреева С.А., Бугорский П.С., Резникова С.А. Введение в культуру тканей розы эфиромасличной и накопление в них терпеноидов // Физиология раст. 1977. Т. 24, № 4. С. 824–831.

101. Кищенко Е.М., Белокурова В.Б., Патон Е.Б., Кучук Н.В. Прострел чернеющий (*Pulsatilla nigricans* Storck.) как объект биотехнологических исследований // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. праць. К.: Логос, 2009. Т. 7. С. 132–142.

102. Ковбасенко Р.В., Дяченко А.И., Дмитрієв О.П. Індукція соматональної варіабельності у рослин томату // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. праць. К.: Логос, 2009. Т. 7. С. 142–147.

103. Козлова О.Н. Анализ гетерогенности полипептидных фракций на начальных этапах побегообразования у *Dendrobium* sp. в культуре *in vitro* // Бюлл. Никитского ботан. сада. 2008. Вып. 97. С. 49–52.

104. Корзина Н.В. Микроразмножение перспективных сортов черешни (*Prunus avium* L.) в условиях *in vitro* // Сборник научных трудов Никитского ботан. сада. 2009. Т. 131. С. 112–117.

105. Косулина Л.Г., Луценко Э.К., Аксенова В.А. Физиология устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды. Ростов на Дону: Изд-во Ростовского ун-та, 2007. 236 с.

106. Кривда С.И., Невкрытая Н.В., Бабанина С.С., Егорова Н.А. Сравнительный анализ потомства растений-регенерантов *Coriandrum sativum* L. / Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки. Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2019. С. 172–174.

107. Круглова Н.Н., Сельдмирова О.А., Веселов Д.С. К вопросу об участии ауксинов в индукции и регуляции морфогенеза в модельной каллусной системе *in vitro* (на примере злаков) // Биомика. 2017. Т. 9, № 4. С. 289–297.

108. Круглова Н.Н., Титова Г.Е., Сельдмирова О.А. Каллусогенез как путь морфогенеза *in vitro* у злаков // Онтогенез. 2018. Т. 49, № 5. С. 273–288.

109. Круглова Н.Н., Сельдмирова О.А., Зинатуллина А.Е. Каллус *in vitro* как модельная система для изучения органогенеза растений // Известия Уфимского научного центра РАН. 2019. № 2. С. 44–54.

110. Кузовкина И.Н., Кузнецова Г.А., Смирнов А.М. Эфирные масла в культуре изолированных тканей растений // Изв. АН СССР, Сер. Биология. 1975. № 3. С. 377–381.

111. Куксова В.Б. Регенерация тетраплоидных растений в культуре *in vitro* винограда // Современные методы и подходы в селекции растений. Кишинев: Штиинца, 1991. С. 56–61.

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

113. Кучеренко Л.А., Харченко П.Н., Ковалева Е.Н. Использование методов биотехнологии в селекции риса // Состояние и развитие

сельскохозяйственной биотехнологии: мат-лы всес. конф. Ленинград, 1986. С. 92–96.

114. Кучулория Т.Л. Итоги селекции герани розовой // Эфирномасличные растения, их культура и переработка. М.: Пищевая промышленность, 1968. С. 39–51.

115. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин. Теорія і практика. К.: Наук. думка, 2005. 270 с.

116. Лаврентьєва А. Використання біотехнологічних методів розмноження декоративних інтродуцентів // Вісник Львівського університету. 2004. Вип. 36. С. 137–145.

117. Левенко Б.А. Клеточная селекция растений на устойчивость к стрессовым факторам: автореф. дисс. на соискание уч. степени докт. биол. наук: спец. 03.00.15 «Генетика». Киев, 1991. 41 с.

118. Лети Д., Калашникова Е.А. Клеточная селекция пшеницы на устойчивость к септориозу // Сельскохозяйственная биотехнология. Избранные работы [Под ред. Шевелухи В.С.]. М.: Евразия, 2000. С. 61–73.

119. Литовкин К.В. Генетические особенности морфогенетических реакций в культуре тканей ячменя: автореф. дисс. на соискание уч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.20 «Биотехнология». Ялта, 2003. 20 с.

120. Лукаткин А.С. Каллусные культуры теплолюбивых растений как объект изучения холодового повреждения и повышения устойчивости // Биотехнология на рубеже двух тысячелетий. Саранск, 2001. С. 238–240.

121. Лукаткин А.С., Гераськина А.В. Скрининг клеточных культур огурца на повышенную холодоустойчивость // Биотехнология. 2003. № 3. С. 65–73.

122. Лукичева Л.А. Биотехнологические приемы оздоровления и клонального микроразмножения вишни (*Cerasus vulgaris* Mill.) и сливы (*Prunus domestica* L.) в Крыму: автореф. дисс. на соискание уч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.20 «Биотехнология». Ялта, 2004. 21 с.

123. Лукомец В.М., Кривошлыков К.М., Зеленцов С.В. и др. Эфиромасличные культуры. Краснодар: Просвещение-Юг, 2017. 295 с.

124. Любченко А.І. Клітинна селекція цикорію коренеплідного (*Cichorium intybus* L.) на стійкість до абіотичних факторів середовища: автореф. дисс. на соискание уч. степени канд. биол. наук: спец. 06.01.05 «Селекция растений». Київ, 2010. 20 с.

125. Манушкина Т.М., Бугаенко Л.А. Біотехнологія клонального мікророзмноження лаванди (*Lavandula angustifolia* Mill.) Бюлл. Никитского бот. сада. – 2009. – В.99. – С.115–118

126. Мардамшин А. Г., Валиева Р.Д., Иванцов А.И., Ильгулова Д.Ф. Каллусная ткань солодки голой – суперпродуцент флавоноидов // Молекул. генет., микробиол. и вирусол. 1994. № 4. С. 21.

127. Мардамшин А.Г., Шарафутдинова Г.Г. Влияние длительности культивирования картофеля *in vitro* на приживаемость растений при переходе от гетеротрофного питания к автотрофному // Биотехнология. 2000. № 3. С. 38–41.

128. Марченко А.О., Голодрига П.Я., Клименко В.П., Пивень Н.М. Соматический эмбрионидогенез в культуре ткани винограда // Физиология и биохимия культ. растений. 1987. Т. 19, № 4. С. 408–411.

129. Марченко А.О. Модель процессов репродукции растений // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: IX междунар. конф., Звенигород, 8-12 сент. 2008 г.: тезисы докл. М.: ИД ФБК-ПРЕСС, 2008. С. 242–243.
130. Марьяхина И.Я., Полумордвинова И.В., Шевченко Н.П. Возможность использования метода полиплоидизации *in vitro* в селекции лука // Сельскохозяйственная биология. 1994. № 5. С. 32–37.
131. Машкина О.С., Сиволапов А.И., Табацкая Т.М., Шабунин Д.А. Рекомендации по микроклональному размножению ценных генотипов тополя сереющего, осины и березы повислой. Воронеж, 2009. 54 с.
132. Машкина О.С., Федулова Т.П., Табацкая Т.М., Кондратьева А.М., Шабанова Е.А. Молекулярно-генетическая и цитогенетическая оценка перспективных гибридов и размноженных *in vitro* клонов тополя и осины // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология, Фармация. 2016. № 2. С. 60–69.
133. Медведева Т.В. Проблемы акліматизації культивованих *in vitro* рослин // Физиология и биохимия культ. растений. 2008. Т 40, № 4. С. 299–308.
134. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин: підручник. К.: Поліграф Консалтинг, 2003. 520 с.
135. Меркурьев А.П., Паштецкий В.С., Немтинов В.И., Скипор О.Б. Селекция лаванды узколистной для промышленного производства в Крыму. Симферополь, 2017, «Диайпи». 206 с.
136. Гирко В.С., Солодовниченко В.Д., Булавна Н.В., Волощук С.И. Методические рекомендации по отбору *in vitro* морозоустойчивых линий *Triticum aestivum*. Мироновка, 1996. 19 с.
137. Митрофанова О.В., Логвиненко И.Е., Иванова Н.Н. Регенерация растений из изолированных органов и тканей *Artemisia balchanorum* Krasch. и *Artemisia scoparia* W. K. // Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур: Тр. ГНБС. 1997. Т. 119. С. 143–153.
138. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. К: Аграрна наука, 2011. 344 с.
139. Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Браилко В.А., Лесникова-Седошенко Н.П. Биотехнологические и физиологические особенности культивирования *in vitro* ценных генотипов розы эфиромасличной // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2015. № 2(13). С. 37–48.
140. Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Иванова Н.Н., Егорова Н.А., Кузьмина Т.Н., Лесникова-Седошенко Н.П., Тевфик А.Ш., Челомбит С.В. Этапы регенерации *in vitro* декоративных, ароматических и плодовых культур / Основы создания генобанка *in vitro* видов, сортов и форм декоративных, ароматических и плодовых культур / под общей редакцией И.В. Митрофановой. Симферополь: ИТ "АРИАЛ", 2018. С. 27–126.
141. Митрофанова И.В., Палий А.Е., Гребенникова О.А., Браилко В.А., Лесникова-Седошенко Н.П., Работягов В.Д., Митрофанова О.В. Адаптационная способность перспективных сортов лаванды и лавандина при культивировании *in vitro* и *ex situ* // Сельскохозяйственная биология. 2018. Т. 53, №3. С. 539–546.
142. Митрофанова И.В., Иванова Н.Н., Палий А.Е., Палий И.Н., Митрофанова О.В. Влияние температурного фактора на особенности

регенерации *Silene jaiensis* N.I. Rubtsov и *Crépis purpurea* (Willd.) M. Bieb. и содержание фенольных веществ в условиях *in vitro* // Бюллетень ГНБС. 2020. Вып. 135. С. 87–96.

143. Молканова О.И. Особенности клонального микроразмножения у различных таксономических групп растений // Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений: Сб. науч. тр., Минск: Изд. центр БГУ, 2008. С. 300–304.

144. Молканова О.И., Королева О.В., Стахеева Т.С., Крахмалева И.Л., Мелешук Е.А. Совершенствование технологии клонального микроразмножения ценных плодовых и ягодных культур для производственных условий // Достижения науки и техники АПК. 2018. Т.32, № 9. С. 66–69.

145. Момот Т.С. Клональное микроразмножение у различных представителей хвойных пород // Физиология и биохимия культ. растений. 1988. Т. 20, № 2. С. 181–189.

146. Моргун В.В., Шапчина Т.М., Кірізій Д.А. Фізіолого-генетичні проблеми селекції рослин у зв'язку з глобальними змінами клімату // Физиология и биохимия культ. растений. 2006. Т. 38, № 5. С. 371–389.

147. Муратова С.А., Папихин Р.В. Получение отдаленных гибридов семечковых плодовых растений и их полиплоидных форм в культуре *in vitro* // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: IX Междунар. конф., Звенигород, 8-12 сент. 2008 г.: тезисы докл. М.: ИД ФБК-ПРЕСС, 2008. С. 266–267.

148. Мусяяка В.К. Культура клеток и тканей томата // Физиология и биохимия культ. растений. 2000. Т. 32, № 2. С. 83–95.

149. Мухитов А.Р., Румянцева Н.И. Высокомутабельные каллусы гречихи татарской, полученные в результате длительного действия колхицина на исходные каллусные культуры // Цитология. 2001. Т. 43, № 4. С. 369–370.

150. Назаренко Л. Г. Селекция розы эфиромасличной. Симферополь: Изд-во ИЭЛР, 1997. 418 с.

151. Назаренко Л.Г., Бугаенко Л.А. Эфиромасличные, пряно-ароматические и лекарственные растения. Симферополь: Таврия, 2003. 202 с.

152. Новикова В.М., Капелев О.И., Теплицкая Л.М., Акимов Ю.А., Работягов В.Д. Морфогенез и регенерация растений в культуре тканей лаванды // Биология культивируемых клеток растений и биотехнология: II междунар. конф.: тезисы докл. Алматы, 1993. С. 65.

153. Носов А.М. Использование клеточных технологий для промышленного получения биологически активных веществ растительного происхождения // Биотехнология. 2010, №5. С. 8–28.

154. Озолина Н.В., Кузеванов В.З., Котова Л.Г., Саляев Р.К. Электрофоретическое изучение белков в морфогенных и неморфогенных каллусах яровой пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений. 1995. Т. 27, № 4. С. 254–258.

155. Основы создания генобанка *in vitro* видов, сортов и форм декоративных, ароматических и плодовых культур. Коллективная монография. Под общей редакцией И.В. Митрофановой; Никитский ботанический сад – ННЦ РАН. Симферополь: «Ариал», 2018. 260 с.

156. Муромцев Г.С., Бутенко Р.Г., Тихоненко Т.И., Прокофьев М.И. Основы сельскохозяйственной биотехнологии. М.: Агропромиздат, 1990. 384 с.
157. Ошмарина В.И., Шамина З.Б., Бутенко Р.Г. Получение резистентных к NaCl и этиоину клеточных линий *Nicotiana sylvestris* и их характеристика // Генетика. 1983. Т. 19, № 5. С. 822–827.
158. Павлова І.О. Особливості культивування стenosпермокарпичного насіння винограду в селекції на безнасінність: автореф. дис. на здобуття наукового ступеня канд. біол. наук. Ялта, 2003. 17 с.
159. Папихин Р.В., Муратова С.А., Дубровский М.Л. Получение и отбор растений с измененным генотипом при полиплоидизации клематиса *in vitro* // Субтропическое и декоративное садоводство. 2009. № 42 (1). С. 174–181.
160. Папихин Р.В., Муратова С.А. Получение межродовых гибридов плодовых семечковых растений с применением метода культуры тканей и полиплоидизации *in vitro* // Сельскохозяйственная биология. 2011. Т.46, № 5. С. 63–68.
161. Пат. 68312 Україна, МПК<sup>6</sup> A01 Н 4/00. Спосіб отримання форм шавлії, стійких до осмотичного стресу *in vitro* / Єгорова Н.О., Ставцева І.В., Пехова О.А. № u 2011 09600; заявл. 01.08.2011; опубл. 26.03.2012, Бюл. № 6.
162. Пат. 7470832 USA, МКИ (Int. Class) A01N63/00, НКІ (Primary Class) 800/295. *In vitro* system of micropropagation of rose scented *Pelargonium graveolens*, of bourbon type / Kumar A.K., Patnaik D.; Reliance Life Sciences Pvt. Ltd. (Maharashtra, IN), A.K. Kumar, D. Patnaik (USA). № 10/453016; Patent (filing date) 06.03.2003; Publ. 12.30.2008.
163. Пат. 01-85775 JP, МКИ (Int. Class) C12N 5/04, Red dye and production of callus containing same. Applicants: Nippon Shokubai Kagaku Kogyo Co LTD./ Publ. N JP 02-265474 A, 30-Oct.-1990; Appl. / Takashi S., Masaharu M., Koichi S., Daizo K. (Inventors). [Электронный ресурс]. URL: <http://ip.com/patapp/JP02265474A>.
164. Паштецкий В.С., Невкрытая Н.В., Мишнев А.В., Назаренко Л.Г. Эфиромасличная отрасль Крыма. Вчера, сегодня, завтра. Симферополь, ИТ «Ариал», 2018. 320 с.
165. Паштецкий В.С., Невкрытая Н.В. Использование эфирных масел в медицине, ароматерапии, ветеринарии и растениеводстве (обзор) // Таврический вестник аграрной науки. 2018. № 1(13). С. 18–40.
166. Пиралов Г.Р., Абраимова О.Е. Влияние биологических особенностей исходного материала и состава питательных сред на каллусогенез и регенерацию в культуре незрелых зародышей кукурузы // Физиология и биохимия культ. растений. 1997. Т. 29, № 1. С. 44–50.
167. Пиралов Г.Р., Абраимова О.Е. Морфологические особенности каллусной ткани кукурузы и пути ее регенерации // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: IX Междунар. конф., Звенигород, 8-12 сент. 2008 г.: тезисы докл. М.: ИД ФБК-ПРЕСС, 2008. С. 298–299.
168. Поливанова О.Б., Чердниченко М.Ю. Пути преодоления витрификации многоколосника фенхельного *Agastache foeniculum* (Pursh) Kuntze (Lamiaceae) в культуре *in vitro* // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2017. Вып. 5. С. 17–28.
169. Потемкина Н.В., Егорова Н.А., Бугара А.М. Цитогенетическое

исследование растений эфиромасличной герани, полученных в культуре тканей // Цитология и генетика. 2004. Т. 38, № 2. С. 26–30.

170. Пугачева С.С., Бугаенко Л.А. Создание исходного материала для селекции фенхеля с использованием метода культуры изолированных зародышей // Современные научные исследования в садоводстве: VIII междунар. конф., Ялта, 2000 г.: мат-лы конф. Ялта, 2000. С. 49–53.

171. Ралдугина Г.Н., Соболева Г.И. Факторы, влияющие на органогенез у семядольных эксплантов рапса // Физиология раст. 1995. Т. 42, № 6. С. 916–922.

172. Рассадина Г.В., Хромова Л.М., Бутенко Р.Г. Эффективность клеточной селекции на устойчивость к кольцевой гнили картофеля // Использование клеточных технологий в селекции картофеля. Науч. Труды НИИ картофельного хозяйства. М., 1987. С. 32–40.

173. Николаев Е.В., Изотов А.М., Чуниховская В.Н., Тарасенко Б.А. Растениеводство Крыма. Симферополь: Таврия, 2008. 290 с.

174. Расторгуев С.Л. Культура изолированных тканей и органов в селекции плодовых растений. Мичуринск : изд-во Мичуринского государственного аграрного университета, 2009. 170 с.

175. Решетников В.Н., Фоменко Т.И., Кузовкова А.А., Бердичевец Л.Г., Малюш М.К. Морфогенный потенциал длительно пассируемых каллусных культур *Nicotiana tabacum* // Бюлл. Никитского ботан. сада. 2009. Вып. 99. С. 103–107.

176. Решетников В., Спиридович Е., Фоменко Т., Носов А. Растительная биотехнология – способ рационального использования биосинтетического потенциала // Наука и инновации. 2014. №5 (135). С. 21–25.

177. Родионенко М.А., Хведынич О.А., Гудзь В.Н. и др. Развитие соматических зародышей в каллусной культуре клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) // Цитология и генетика. 1994. Т. 28, № 5. С. 15–20.

178. Родов В.С. Биосинтез терпеноидов в культуре клеток ментолсинтезирующих мят: автореф. дисс. на соискание уч. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.13 «Физиология растений». Москва, 1985. 24 с.

179. Рожанская О.А. Соя и нут в Сибири: культура тканей, соматклоны, мутанты. Новосибирск: Юпитер, 2005. 155 с.

180. Русина Л.В., Бугара А.М., Бугаенко Л.А. Использование метода культуры изолированных зародышей для получения межвидовых гибридов шалфея // Физиология и биохимия культ. растений. 1997. Т. 29, № 2. С. 121–128.

181. Саркисян Э.Д., Майрапетян С.Х., Тамбиян Н.Н., Серобян А.Р. Культивирование герани сопряженным методом клонального микроразмножения и гидропонии // Физиология растений – наука 3-го тысячелетия: междунар. конф., Москва, 4-9 окт., 1999 г.: тезисы докл. М., 1999. Т.2. С. 688.

182. Сёке Е., Шаварда А.Л., Кузовкина И.Н. Влияние условий выращивания каллусной ткани соцветий ромашки лекарственной на образование в ней эфирного масла // Физиология раст. 1978. Т. 25, Вып. 4. С. 743–749.

183. Селекция эфиромасличных культур. Методические указания / под ред. А.И. Аринштейн. Симферополь, 1977. 150 с.

184. Сельдемирова О.А., Катасонова А.А., Круглова Н.Н. Формирование морфогенетического очага как начальный этап морфогенеза *in vitro* в каллусах различного происхождения у пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений. 2011. Т. 42, № 4. С. 297–306.
185. Сельдемирова О.А., Круглова Н.Н., Зинатуллина А.Е. Роль фитогормонов в индукции каллусогенеза и регуляции путей морфогенеза каллусов злаков *in vitro* // Научный результат. Серия физиол. 2017. Т. 3, № 1. С. 8–13.
186. Сельдемирова О.А., Кудоярова Г.Р., Круглова Н.Н., Галин И.Р., Веселов Д.С. Способность к соматическому эмбриогенезу *in vitro* в каллусах пшеницы и ячменя определяется балансом содержания в них ИУК и АБК // Онтогенез. 2019. Т. 50, № 3. С. 181–193.
187. Сельскохозяйственная биотехнология: учеб. [Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Дегтярев С.В., Кочиева Е.З.] М.: Высш. шк., 1998. 416 с.
188. Семенова Е.Ф., Преснякова Е.В., Жужжалова Т.П. Репродуктивная биология видов и форм *Rosa L.* Воронеж: Изд-во ЦНТИ, 2014. 136 с.
189. Сергеева Л.Е., Труханов В.А. Получение клеточных линий растений, устойчивых к вольфраму // Физиология и биохимия культ. растений. 1997. Т. 29, № 1. С. 51–55.
190. Сергеева Л.Е., Михальская С.И., Порцкая Е.Н. Роль свободной пролина в поддержании солеустойчивости клеточных линий табака и сои, отобранных на селективных средах с ионами бария // Физиология и биохимия культ. растений. 2008. Т. 40, № 6. С. 532–536.
191. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. Киев: Наук. думка, 1990. 280 с.
192. Скаукрофт У.Р. Соматическая изменчивость: миф о клональном единообразии // В кн.: Мобильность генома растений. М.: ВО «Агропромиздат», 1990. С. 228–260.
193. Скороход В.О. Промислова біотехнологія мікроклонального розмноження винограду в культурі *in vitro*. Херсон: Айлант, 2000. 328 с.
194. Смолянов А.М., Ксендз А.Т. Эфиромасличные культуры. М.: Колос, 1976. 336 с.
195. Соболева Г.В. Использование культуры тканей *in vitro* в селекции гороха: автореф. дисс. на соискание уч. степени канд. с.-х. наук: спец.: 03.00.23 «Биотехнология». Орел, 2005. 20 с.
196. Сопина Н.Ф., Карасев Г.С. Влияние холодового закаливания и АБК на морозоустойчивость суспензионной культуры пшеницы *Triticum timopheevi* // III съезд всерос. об-ва физиологов растений: тезисы. докл. С.-Пб., 1993. С. 732.
197. Ставцева И.В., Егорова Н.А. Культура изолированных зародышей шалфея и ее использование в селекции: методические рекомендации. Симферополь: ИЭЛР НААНУ, 2011. 20 с.
198. Ставцева И.В., Егорова Н.А. Использование метода эмбриокультуры в селекции розы эфиромасличной // Виноградарство и виноделие. 2013. №1. С. 17–19.
199. Ставцева И.В., Егорова Н.А. Изучение перспективных образцов шалфея мускатного, полученных с использованием биотехнологических методов / Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной

науки. Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2018. С. 79–80.

200. Ставцева И.В., Егорова Н.А. Получение и размножение гибридов розы эфиромасличной в культуре *in vitro*. Методические рекомендации. Симферополь: типография ИП Бражников Д.А., 2016. 24с.

201. Ставцева И.В., Егорова Н.А. Анализ потомства растений-регенерантов шалфея мускатного по комплексу признаков // Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки. Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2019. С. 241–243.

202. Страшнюк Н.М., Кравець Н.Б., Конвалюк І.І., Мельник В.М. Органогенез у культурі тканин видів роду тирлич (*Gentiana L.*) // Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наук. праць. Київ: ЛОГОС, 2009. Т. 7. С. 184–189.

203. Струнин Д.Е., Сергеева Л.Е., Тищенко Е.Н. Регенерация растений путем прямого органогенеза из сегментов проростков элитных инбредных линий кукурузы // Физиология и биохимия культ. растений. 2008. Т. 40, № 2. С. 164–170.

204. Сытник И.Д., Коломиец Ю.В. Морфогенез в культуре *in vitro* разных сортов ярового и озимого рапса // Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений: 3-я Междунар. науч. конф., Минск, 14-16 мая 2008 г.: сб. науч. тр. Минск: Изд. Центр БГУ, 2008. С. 319–322.

205. Табацкая Т.М., Аминева Е.Ю., Машкина О.С. Биотехнологическая оценка коллекционного материала березы и тополя в условиях солевого стресса в культуре *in vitro* // Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки: мат-лы V между. конф. Симферополь : ИТ«АРИАЛ», 2020. С. 190–191.

206. Тевфик А.Ш., Егорова Н.А. Особенности индукции каллусо- и морфогенеза фенхеля обыкновенного в зависимости от возраста проростков // Бюллетень ГНБС. – 2019. – Т.133. – С.101–108.

207. Тевфик А.Ш., Егорова Н.А. Влияние условий культивирования и гормонального состава питательной среды на микроразмножение *in vitro* тимьяна обыкновенного // Таврический Вестник Аграрной Науки. 2019. № 1 (17). С. 93–102.

208. Тищенко Е.Н., Сергеева Л.Е., Михальская С.И., Данильченко О.А. RAPD-анализ вольфрамустойчивой клеточной линии сои с комплексной толерантностью к осмотическим веществам // Физиология и биохимия культ. растений. 2008. Т. 40, № 64. С. 329–336.

209. Ткаченко К.Г. Эфирномасличные растения и эфирные масла: достижения и перспективы, современные тенденции изучения и применения // Вестник Удмуртского университета. 2011. Вып. 1. С. 88–99.

210. Третьякова И.Н., Иваницкая А.С. Гормональная регуляция морфогенеза клеток при образовании эмбрионного каллуса и соматических зародышей у сибирских видов хвойных // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: IX междунар. конф., Звенигород, 8-12 сент. 2008 г.: тезисы докл. М.: ИД ФБК-ПРЕСС, 2008. С. 406–407.

211. Трунов Ю.В., Соловьев Ф.В., Козлова И.И., Муратова С.А. Технологии выращивания высококачественного посадочного материала плодовых и ягодных растений. Мичуринск: ООО «БИС», 2018. 246 с.

212. Шуклина А.С., Третьякова И.Н. Соматический эмбриогенез видов рода *Pinus* в культуре *in vitro* // Успехи современной биологии. 2019. Т. 139, № 2. С. 184–195.

213. Тугай Ю.А., Чугункова Т.В., Розумна Л.Ф. Реакція калюсних культур буряків (*Beta vulgaris* L.) на сольовий стрес // Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наук. праць. Київ: ЛОГОС, 2006. Т. 3. С. 515–518.

214. Тучин С.В., Архипова Л.Н., Носова Н.Н., Сахаджи Т.Н. Оценка различных селективных схем для отбора на засухоустойчивость в культуре изолированных тканей пшеницы. В кн.: Биологические основы селекции. Саратов, 1991. С. 41–48.

215. Фоменко Т.И., Малюш М.К. Морфогенная активность и регенерация растений в культуре ткани различных видов люпина // Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наук. праць. К.: ЛОГОС, 2011. Т. 11. С. 432–437.

216. Хасси Г. Размножение сельскохозяйственных культур *in vitro* // В кн.: Биотехнология сельскохозяйственных растений. М.: Агропромиздат, 1987. С. 105–133.

217. Хромова Л.М. Возможности соматической вариабельности генотипов картофеля для улучшения сортов // Исследования по клеточной селекции картофеля. Научные труды НИИ картофельного хозяйства. М., 1984. С. 68–75.

218. Хромова Л.М. К вопросу о методологии клеточной селекции *in vitro* // Использование клеточных технологий в селекции картофеля. Научные труды НИИ картофельного хозяйства. М., 1987. С. 40–46.

219. Черевченко Т.М., Лаврентьева А.Н., Иванников Р.В. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro*. К: Наук. думка, 2008. 560 с.

220. Чередниченко М.Ю., Мубарак М.М. Использование технологии *in vitro* для сохранения и размножения мяты болотной (*Mentha pulegium* L.) как продуцента лекарственных веществ // Труды КубГАУ. 2015. № 55. С. 278–282.

221. Чеченева Т.Н., Труханов В.А. Повышение регенерационной способности у инбредных линий кукурузы *in vitro* // Цитология и генетика. 1997. Т. 31, № 2. С. 36–40.

222. Чеченева Т.Н., Ларченко Е.А. Влияние химических мутагенов и гамма-облучения на культуру *in vitro* инбредных линий кукурузы // Цитология и генетика. 1997. Т. 31, № 3. С. 65–71.

223. Чеченева Т.Н. Изменчивость *in vitro* у кукурузы, индуцированная 1,4-бис-диазоацетилбутаном // Физиология и биохимия культ. растений. 2001. Т. 33, № 6. С. 480–484.

224. Чеченева Т.Н. Изменчивость злаков в культуре *in vitro* и в процессе регенерации растений // Физиология и биохимия культ. растений. 2006. Т. 38, № 2. С. 163–175.

225. Чугункова Т.В., Юркова Г.Н., Розумна Л.Ф., Шевцов И.А. Регенерационная способность сортов и селекционных образцов кормовой свеклы // Физиология и биохимия культ. растений. 1994. Т. 26, № 6. С. 572–575.

226. Шамина З.Б. Генетическая изменчивость в популяциях соматических клеток растений в культуре: автореф. дисс. на соискание уч.

степени докт. биол. наук: спец. 03.00.15 «Генетика». Ленинград, 1988. 35 с.

227. Шаяхметов И.Ф. Роль лектина пшеницы и абсцизовой кислоты в регенерации растений // Успехи современной биологии. 2004. Т. 124, № 6. С. 602–611.

228. Шутова С.В. Ароматерапия: физиологические эффекты и возможные механизмы (обзор литературы) // Вестник Тамбовского университета. Серия «Естественные и технические науки». 2013. Т. 18, № 4-1. С. 1330–1336.

229. Щербакова Е.Н., Севрук О.Г., Маршавина З.В. Влияние компонентов питательной среды на рост изолированной ткани *Pelargonium roseum* // Физиология раст. 1977. Т. 24, Вып. 3. С. 648–652.

230. Щуплецова О.Н. Получение в селективных системах *in vitro* генотипов ячменя с комплексной устойчивостью к почвенным стрессовым факторам // Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки: мат-лы V межд. конф. Симферополь : ИТ«АРИАЛ», 2020. С. 194–196.

231. Юрин В.М., Дитченко Т.И., Молчан О.В., Шапчиц М.П., Ромашко С.Н., Булатова А.А., Логвинова А.О. Культура растительных клеток и тканей: технология получения, разнообразие фармакологически активных метаболитов и приемы регуляции их синтеза // Труды БГУ. 2009. Т. 4, Ч. 2. С. 168–182.

232. Юрьева Н.О. Изучение различий в вариационных потенциях генотипов сортов картофеля // Использование клеточных технологий в селекции картофеля. Научные труды НИИ картофельного хозяйства. М., 1987. С. 6–10.

233. Якимова О.В., Егорова Н.А. Индукция каллусогенеза в культуре изолированных органов *Origanum vulgare* L. // Масличные культуры. 2014. Вып. 2 (159-160). С. 81–86.

234. Якимова О.В., Егорова Н.А. Каллусогенез и морфогенез в культуре изолированных органов и тканей *Melissa officinalis* L. *in vitro* // Ученые записки ТНУ. 2014. Т. 27 (66), №5. С. 191–201.

235. Якимова О.В., Егорова Н.А. Исследование влияния некоторых факторов на каллусообразование у Melissa (*Melissa officinalis* L.) в культуре *in vitro* // Вестник Удмуртского университета. Серия №6 Биология. Науки о Земле. 2014. Вып.4. С. 39–43.

236. Якимова О.В., Егорова Н.А. Влияние состава питательной среды и генотипа на клональное микроразмножение душицы *in vitro* // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2015. №3(54). С. 138–142.

237. Якимова О.В., Егорова Н.А. Влияние состава питательной среды, типа экпланта и генотипа на клональное микроразмножение *Melissa officinalis* L. // Ученые записки Крымского федерального университета ТНУ им. В.И. Вернадского. Биология. Химия. 2018. Т. 4. (70). № 1. С. 158–167.

238. Abd-Allah R.H., Abo Zeid E.M., Zakaria M.M., Eldahmy S.I. Micropropagation of wild fennel (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare*) via organogenesis and somatic embryogenesis // J. Dev. Biol. Tissue Eng. 2015. Vol. 7 (1). P. 001–010.

239. Afful N.T., Nyadanu D., Akromah R., Amoatey H.M., Mohammed F.,

Annor C. In-vitro regeneration of interspecific hybrids in eggplant species via seed and embryo culture // Plant Breed. Biotech. 2020. Vol. 8. P. 226–237.

240. Aggarwal K.K., Ahmad A., Kumar S., et al. *Pelargonium* spp. (Geranium): *In vitro* culture and the production of aromatic compounds. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry 15: Medicinal and Aromatic Plants 3 / Ed. Y.P.S. Bajaj. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2000. 339. 52 p.

241. Akin-Idowu P.E., Ibitoye D.O., Ademoyegun O.T. Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops // African J. of Biotechnology. 2009. Vol. 8, No. 16. P. 3782–3788.

242. Akram Zia, Farkhonde Rezanejad, Abbas Safarnejad *In vitro* selection for NaCl tolerance in *Thymus vulgaris* L. // J. of Cell and Molecular Research. 2010. Vol. 2 (2). P. 86–92.

243. Ali M., Mujib A., Tonk D., Zafar N. Plant regeneration through somatic embryogenesis and genome size analysis of *Coriandrum sativum* L. // Protoplasma. 2017. No. 254 (1). P. 343–352.

244. Ali M., Mujib A., Zafar N., Tonk D. Protoplast isolation and plant regeneration in two cultivated coriander varieties, Co-1 and RS // J. of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology. 2018. Vol. 99, No. 4. P. 345–355.

245. Alimgazinova B. New technologies in medicinal plants cultivation // Biotechnology Approaches for Exploitation and Preservation of Plant Resources: Intern. symp., Yalta, 26-31 may 2002: abstracts. Yalta: "Крым-Фарм-Трейддинг", 2002. P. 25.

246. Alsemaan T. Micro-propagation of Damask Rose (*Rosa damascena* Mill.) cv. Almarah // International Journal of Agricultural Research. 2013. Vol. 8, No. 4. P. 172–177.

247. Amutha R., Jawahar M., Ravi P.S. Plant regeneration and *in vitro* flowering from shoot tip of *Basilicum polystachyon* (L.) Moench – an important medicinal plant // J. of Agricultural Technology. 2008. Vol. 4, No. 2. P. 117–123.

248. Ananthkrishnan G., Ravikumar R., Anand R.P., Vengadesan G., Ganapathi A. Induction of somatic embryogenesis from nucellus-derived callus of *Anacardium occidentale* L. // Sci. Hort. (Neth.). 1999. Vol. 79, No. 1-2. P. 91–99.

249. Andarwulan N., Shetty K. Phenolic content in differentiated tissue cultures of untransformed and *Agrobacterium*-transformed roots of anise (*Pimpinella anisum* L.) // Agric. Food Chem. 1999. Vol. 47, No. 4. P. 1776–1780.

250. Andrade L.B., Echeverrigaray S., Fracaro F., Pauletti G.F., Rota L. The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC) // Plant Cell Tissue Org. Cult. 1999. Vol. 56, No. 2. P. 79–83.

251. Anzidei M., Bennici A., Schiff S., Tani C., Mori B. Organogenesis and somatic embryogenesis in *Foeniculum vulgare*: histological observations of developing embryogenic callus // Plant Cell, Tissue Org. Cult. 2000. Vol. 61, No. 1. P. 69–79.

252. Arikat N.A., Jawad F.M., Karam N.S., Shibli R.A. Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.) // Sci. Hort. 2004. Vol. 100, No. 1-4. P. 193–202.

253. Arzani A., Mirodjagh S.-Sh. Response of durum wheat cultivars to immature embryo culture, callus induction and *in vitro* salt stress // Plant Cell,

Tissue Org. Cult. 1999. Vol. 58, No. 1. P. 67–72.

254. Arzani A. Improving salinity tolerance in crop plants: A biotechnological view // *In Vitro Cell. Develop. Biol. Plant.* 2008. Vol. 44, No. 5. P. 373–383.

255. Asoko N., Ruamrungsri S., Yoosumran V., Saetiew, K. Improvement of *Dendranthemum grandiflora* cv. canter with colchicine *in vitro* // *International Journal of Agricultural Technology.* 2020. Vol. 16, No. 2. P. 237–246.

256. Avato P., Fortunato I.M., Ruta C. D'Elia R. Glandular hairs and essential oils in micropropagated plants of *Salvia officinalis* L. // *Plant Science.* 2005. Vol. 169, No. 1. P. 29–36.

257. Badzhelova V. *In vitro* propagation of oil-bearing rose (*Rosa damascena* Mill.) // *Agricultural science and technology.* 2017. Vol. 9, No. 3. P. 194–197.

258. Baig M.M.Q., Hafiz I.A., Hussain A., Ahmad T., Abbasi N.A. / An efficient protocol for *in vitro* propagation of *Rosa gruss an teplitz* and *Rosa centifolia* // *Afr. J. Biotechnology.* 2011. Vol. 10, No. 22. P. 4564–4573.

259. Bajaj Y.P.S., R.K. Gupta Different tolerance of callus cultures of *Pennisetum americanum* L. and *P. purpureum* Schum. to sodium chloride // *J. Plant Physiol.* 1986. No. 125. P. 491–495.

260. Bakhtiar Z., Mirjalili M.H., Sonboli A. *In vitro* callus induction and micropropagation of *Thymus persicus* (Lamiaceae), an endangered medicinal plant // *Crop Breeding and Applied Biotechnology.* 2016. Vol. 16. P. 48–54.

261. Bala Sirisha K., Sujathamma P. *In vitro* propagation of few Pimpinella species: a review // *Research J. of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences.* 2018. Vol 4 (5). P. 336–344.

262. Banerjee S., Haider F., Bagchi G.D., Samad A. Regeneration of phytoplasma-free *Artemisia roxburghiana* Besser var. *purpurascens* (Jacq.) Hook. plants using apical meristem culture // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 2010. Vol. 103, No. 2. P. 189–196.

263. Banthorpe D. V., Branch S.A., Njar V.C.O., Osborne M.G., Watson D.G. Ability of plant callus cultures to synthesize and accumulate lower terpenoids // *Phytochemistry.* 1986. Vol. 25, No. 3. P. 629–636.

264. Banthorpe D.V., Grey T., Poots I., Fordham W. Monoterpene metabolism in cultures of *Rosa* species // *Phytochemistry.* 1986. Vol. 25, No. 10. P. 2321–2326.

265. Banthorpe D.V., Branch S.A., Poots I., Fordham W.D. Accumulation of 2-phenylethanol by callus derived from leaf-bud of *Rosa damascena* // *Phytochemistry.* 1988. Vol. 27, No. 3. P. 795–801.

266. Banthorpe D.V., Brown J.T., Morris G. Accumulation of the anti-fungal diterpene sclareol by cell cultures of *Salvia sclarea* and *Nicotiana glutinosa* // *Phytochemistry.* 1990. Vol. 29, No.7. P. 2145–2148.

267. Banthorpe D.V., Bates M.J., Ireland M.J. Stimulation of accumulation of terpenoids by cell suspensions of *Lavandula angustifolia* following pre-treatment of parent callus // *Phytochemistry.* 1995. Vol. 40, No. 1. P. 83–87.

268. Bartolozzi F., Mencuccini M., Fontanazza G. Enhancement of frost tolerance in olive shoots *in vitro* by cold acclimation and sucrose increase in the culture medium // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 2001. Vol. 67, No. 3. P.

299–302.

269. Bela J. S., Shetty K. *In vitro* developmental response of anise to growth regulators and establishment of a clonal propagation system // Acta Hort. (ISHS). 1996. Vol. 426. P. 483–488.

270. Bela J., Ueno K., Shetty K. Control of hyperhydricity in anise (*Pimpinella anisum*) tissue culture by *Pseudomonas* spp. // J. of Herbs, Spices and Medicinal Plants. 1998. Vol. 6, No. 1. P. 57–67.

271. Bela J., Shetty K. Somatic embryogenesis in anise (*Pimpinella anisum* L.): the effect of proline on embryogenic callus formation and ABA on advanced embryo development // J. Food Biochemistry. 1999. Vol. 23, No. 1. P. 17–32.

272. Benjamin B.D., Sipahimalani A.T., Heble M.R. Tissue cultures of *Artemisia pallens*: organogenesis, terpenoid production // Plant Cell and Organ Cult. 1990. Vol. 21, No. 2. P. 159–164.

273. Bennici A., Anzidei M., Vendramin G.G. Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis // Plant Science. 2004. Vol. 166, No. 1. P. 221–227.

274. Bertin P., Kinet J.M., Bouharmont J. Heritable chilling tolerance improvement in rice through somaclonal variation and cell line selection // Australian Journal of Botany. 1996. Vol. 44, No. 1. P. 91–105.

275. Bhat S., Maheshwari P., Kumar S., Kumar A. Mentha species: *In vitro* Regeneration and Genetic Transformation // Molecular Biology Today. 2002. Vol. 3, No. 1. P. 11–23.

276. Bhat S., Kaushal P., Kaur M., Sharma H. K. Coriander (*Coriandrum sativum* L.): Processing, nutritional and functional aspects // African Journal of Plant Science. 2014. Vol. 8, No. 1. P. 25–33.

277. Bhojwani S., Mullins K., Cohen D. Intra-varietal variation for *in vitro* plant regeneration in the genus *Trifolium* // Euphytica. 1984. Vol. 33, No. 3. P. 915–921.

278. Bishimbayeva N. K. A role for apoptosis and polysaccharide secretion in the long-term somatic embryogenesis of cereals // Bull. Nikit. Botan. Gard. 2002. No. 86. P. 19–22.

279. Bolouk S.G., Kazemitabar S.K. A., Sinaki J.M. *In vitro* culture of the peppermint plant (*Mentha piperita*) without the use of hormones // Int. J. Agri. Crop Sci. 2013. Vol. 6 (18). P. 1279–1283.

280. Borchetia S., Das S.C., Handique P.J., Das S. High multiplication frequency and genetic stability for commercialization of the three varieties of micropropagated tea plants (*Camellia* spp.) // Sci. Hort. 2009. Vol. 120, No. 4. P. 544–550.

281. Bosh A., Moieni A., Dehghani H., Movahedi Z. *In Vitro* Propagation of damask rose using the temporary immersion system // J. of Plant Physiology and Breeding. 2016. Vol. 6, No. 2. P. 9–18.

282. Brown J.T., Charlwood B.V. The control of callus formation and differentiation in scented *Pelargoniums* // J. Plant Physiol. 1986. Vol. 123, No. 5. P. 409–417.

283. Brown J.T., Hegarty P.K., Charlwood B.V. The toxicity of monoterpenes to plant cell cultures // Plant Sci. 1987. Vol. 48, No. 3. P. 195–201.

284. Bu R., Chen L., Mao S., Wang H. Plant regeneration through callus initiation from mature embryo of *Triticum* // Plant Breed. 2007. Vol. 126, No. 1. P. 9–12.

285. Burbulis N., Kupriene R., Blinstrubiene A. Investigation of cold resistance of winter rapeseed *in vitro* // Horticulture and Lithuanian University of agriculture. Sodininkyste ir darzininkyste. 2008. Vol. 27, No. 4. P. 223–232.
286. Calvo M.C., Segura J. *In vitro* morphogenesis from explants of *Lavandula latifolia* and *Lavandula stoechas* seedlings // Scientia. Hort. 1988. No. 36. P. 131–137.
287. Calvo M.C., Segura J. Plant regeneration from cultured leaves of *Lavandula latifolia* Medicus: Influence of growth regulators and illumination conditions // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 1989. Vol. 19, No. 1. P. 33–42.
288. Calvo M.C., Segura J. *In vitro* propagation of lavender // Hort. Sci. 1989. Vol. 24, No. 2. P. 375–376.
289. Calvo M.C., Sánchez-Gras M.C. Accumulation of monoterpenes in shoot-proliferation cultures of *Lavandula latifolia* // Med. Plant Science. 1993. Vol. 91, No. 2. P. 207–212.
290. Canly F.A., Kazaz S. Biotechnology of roses: progress and future prospects // Suleyman Demirel Universitesi Orman Fakultesi Dergisi. 2009. S.A, No.1. P. 167–183.
291. Cardoso J.C., Gerald L.T.S., Teixeira da Silva J.A. Micropropagation in the Twenty-First Century. In: Plant cell culture protocols (4<sup>th</sup> edition) / Eds.: V.M. Loyola-Vargas, N. Ochoa-Alejo. New York, NY: Humana Press, 2018. P. 17–46.
292. Carmen G., Hancu G. Antimicrobial and Antifungal Activity of *Pelargonium roseum* Essential Oils // Adv. Pharm. Bull. 2014. Vol. 4 (Suppl 2). P. 511–514.
293. Cassells A.C., Minas G. Plant and *in vitro* factors influencing the micropropagation of *Pelargonium* cultivars by bud-tip culture // Sci. Hort. 1983. Vol. 21. No. 1. P. 53–65.
294. Castillo P., Marquez J., Rubluo A., Hernandez G., Lara M. Plant regeneration from callus and suspension cultures of *Valeriana edulis* ssp. *procera* via simultaneous organogenesis and somatic embryogenesis // Plant Science. 2000. Vol. 151, No. 2. P. 115–119.
295. Cavallini A., Cremonini R., Lupi M.C., Bennici A. *In vitro* culture of *Dellevalia romana* L. Rchb. II. Cytological study of callus and regenerated plantlets // Protoplasma. 1986. Vol. 132, No. 1-2. P. 58–63.
296. Cellarova E., Grelakova K., Repcak M., Honcariv R. Morphogenesis in callus tissue cultures of some *Matricaria* and *Achillea species* // Biologia Plantarum. 1982. Vol. 24, No. 6. P. 430–433.
297. Cellarova E., Repcakova K., Repcak M., Honcariv R. Morphogenesis in tissue cultures of some medicinal plants // Acta Hort. (ISHS). 1983. No. 132. P. 249–256.
298. Chakraborty A., Chattopadhyay S. Stimulation of menthol production in *Mentha piperita* cell culture // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2008. Vol. 44, No. 6. P. 518–524.
299. Chakravarty Bipasha, Goswami B. Plantlet regeneration from long-term callus cultures of *Citrus acida* Roxb. and the uniformity of regenerated plants // Sci. Hort. (Neth.). 1999. Vol. 82, No. 1-2. P. 159–169.
300. Chandrasekhara Reddy M., Sri Rama Murthy K., Pullaiah T. Synthetic seeds: A review in agriculture and forestry // African Journal of Biotechnology.

2012. Vol. 11, No. 78. P. 14254–14275.

301. Charlwood B.V., Charlwood K.A., Brown J.T. The effect of product removal on the accumulation of monoterpenes in *Pelargonium* cultures // IV Eur. Congress Biotechnol., Amsterdam, 14-19 June 1987: Proc. Amsterdam etc., 1987. Vol. 2. P. 444–446.

302. Ching-Fen Wu, Karioti A., Rohr D., Bilia A.R., Efferth T. Production of rosmarinic acid and salvianolic acid B from callus culture of *Salvia miltiorrhiza* with cytotoxicity towards acute lymphoblastic leukemia cells // Food Chemistry. 2016. Vol. 201, No. 15. P. 292–297.

303. Chishti N., Kaloo Z.A., Shawl A.S., Sultan Ph. Rapid *in vitro* clonal propagation of *Lavandula officinalis* chaix a multipurpose plant of industrial importance // Pakistan J. of Biol. Sciences. 2006. No. 9. P. 514–518.

304. Corredoira E., Ballester A., Vieitez A.V. Proliferation, maturation and germination of *Castanea sativa* Mill. somatic embryos originated from leaf explants // Ann. Bot. 2003. Vol. 92, No. 1. P. 129–136.

305. Crouch N.R., Staden L.E., Staden J., Drewes F.E., Drewes S.E., Meyer H.J. Accumulation of cyanidin-3-glucoside in callus and cell cultures of *Oxalis reclinata* // J. Plant Physiol. 1993. Vol. 142, No. 1. P. 109–111.

306. Cui J., Chen J., Henny R.J. Regeneration of *Aeschynanthus radicans* via direct somatic embryogenesis and analysis of regenerants with flow cytometry // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2008. Vol. 45, No. 1. P. 34–43.

307. Cuenca S., Amo-Marko J.B. *In vitro* propagation of two spanish endemic species of *Salvia* through bud proliferation // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2000. Vol. 36, No. 2. P. 225–229.

308. Dasgupta M., Sahoo M.R., Kole P.C., Mukherjee A. Evaluation of orange-fleshed sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) genotypes for salt tolerance through shoot apex culture under *in vitro* NaCl mediated salinity stress conditions // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2008. Vol. 94, No. 2. P. 61–170.

309. De Jong J., Custers J.B.M. The effect of explant source, *in vitro* regeneration and irradiation on variation in yield induced in *Chrysanthemum morifolium* // Gen Manipulat., Plant Breed.: Intern. Symp., Berlin, New York, 8-13 Sept., 1985: Proc. Berlin, New York, 1986. P. 607–609.

310. Decout L., Dubois T., Guedira M., Dubois J., Audran J.-C., Vasseur J. Role of temperature as a triggering signal for organogenesis or somatic embryogenesis in wounded leaves of chicory cultured *in vitro* // J. Exp. Bot. 1994. Vol. 45, No. 12. P. 1859–1865.

311. Dekeyser Q., Lhoest J., Van Caneghem L., Bouharmont J. Selection and characterization of cold- and salt- tolerant rice varieties by *in vitro* culture techniques // Med. Fac. Landbouww. Rijksun. 1987. Vol. 52, No. 4a. P. 1439–1448.

312. Delporte F., Mostadel O., Jacquemin J. Plant regeneration through callus initiation from thin mature embryo fragments of wheat // Plant Cell, Tissue, Organ Cult. 2001. Vol. 67, No. 2. P. 73–80.

313. Desai N.S., Suprasanna P., Bapat V.A. Simple and reproducible protocol for direct somatic embryogenesis from cultured immature inflorescence segments of sugarcane (*Saccharum* spp.) // Curr. Sci. 2004. Vol. 87, No. 6. P. 764–768.

314. Dhandapani M., Kim D.H., Hong S.B. Efficient plant regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis from the explants of *Catharanthus roseus*

// In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2008. Vol. 44, No. 1. P. 18–25.

315. Dias M.C., Almeida R., Romano A. Rapid clonal multiplication of *Lavandula viridis* L'Her through *in vitro* axillary shoot proliferation // Plant Cell Tissue Org. Cult. 2002. Vol. 68, No. 1. P. 99–102.

316. Dolezel J., Binarova P. The effect of colchicine on ploidy level, morphology and embryogenic capacity of alfalfa suspension cultures // Plant Sci. 1989. Vol. 64, No. 2. P. 213–219.

317. Dragiiska R., Djilianov D., Denchev P., Atanasov A. *In vitro* selection for osmotic tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) // Bulg. J. Plant Physiol. 1996. Vol. 22, No. 3-4. P. 30–39.

318. Dronne S., Jullien F., Caissard J.-C., Faure O. A simple and efficient method for *in vitro* shoot regeneration from leaves of lavender (*Lavandula intermedia* Emeric ex Loiseleur) // Plant Cell Reports. 1999. Vol. 18, No. 8. P. 429–433.

319. Dronne S., Moja S., Jullien F., Berger F., Caissard J.-C. *Agrobacterium* mediated transformation of lavender (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur) // Transgenic Research. 2004. Vol. 8, No. 5. P. 335–347.

320. Du Manoir J., Desmarest P., Saussay R. *In vitro* propagation of fennel (*Foeniculum vulgare* Miller) // Sci. Hort. 1985. Vol. 27, No. 1-2. P. 15–19.

321. Duan Y.-Z., Ke S.-Y., Cao J., Niu Y.-Z., Peng C.-Z. Study on induction of polyploidy in *Salvia bowleyana* by colchicines treatment // Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2006. Vol. 31, No. 6. P. 445–448. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16722367>.

322. Dunbar K.B., Stephens C.T. An *in vitro* screen for detecting resistance in *Pelargonium* somaclones to bacterial blight of geranium // Plant Disease. 1989. Vol. 73, No. 11. P. 910–912.

323. Dunbar K.B., Stephens C.T. Shoot regeneration of hybrid seed geranium (*Pelargonium x hortorum*) and regal geranium (*Pelargonium x domesticum*) from primary callus cultures // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1989. Vol. 19, No. 1. P. 13–21.

324. Duncan D.R., Widholu J.M. Proline accumulation and its implication in cold tolerance of regenerable maize callus // Plant Physiol. 1987. Vol. 83, No. 3. P. 703–708.

325. Ebrahimie E., Habashy A.A., Mohammadie-Dehcheshmeh M., Ghannadha M.R., Ghareyazie B., Yazdi-Amadi B. Direct shoot regeneration from mature embryo as a rapid and genotype-independent pathway in tissue culture of heterogeneous diverse sets of cumin (*Cuminum cyminum* L.) genotypes // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2006. Vol. 42, No. 5. P. 455–460.

326. Ebrahimie E., Hosseinzadeh A., Nagavi M.R., Ghannadha M.R., Mohammadie-Dehcheshmeh M. Combined direct regeneration protocols in tissue culture of different cumin genotypes based on pre-existing meristems // Pakistan J. of Biological Sciences. 2007. Vol. 10, No. 9. P. 1360–1370.

327. Echeverrigaray S., Basso R., Andrade L.B. Micropropagation of *Lavandula dentata* from axillary buds of field-grown adult plants // Biol. Plantarum. 2005. Vol. 49, No. 3. P. 439–442.

328. Echeverrigaray S., Postingher Carrer R., Bavaresco Andrade L. Micropropagation of *Salvia guaranitica* Benth. through axillary shoot proliferation // Braz. arch. biol. technol. 2010. Vol. 53, No. 4. P. 883–888.

329. Eguchi Y., Bela J.S., Shetty K. Stimulation of somatic embryogenesis in anise (*Pimpinella anisum*) using fish protein hydrolysates and proline // J. Herbs, Spices and Medicinal Plants. 1998. Vol. 5, No. 3. P. 61–68.
330. El-Sharnouby M.E., Khattab Eman A.H., Saqer S. Alotaibi, Haya Mohammed M.A. Production of Apple Mosaic Virus-Free Pear and *Rosa damascena* Plants Through Tissue Culture // Research & Reviews: Journal of Botanical Sciences. 2019. Vol. 8, No. 2. P. 9–17.
331. Ernst D. *Pimpinella anisum* L. (Anise): Cell culture, somatic embryogenesis and the production of anise oil // Med. and Aromat. Plants 2 / D. Ernst. Berlin etc., 1989. –P. 381–397.
332. Esitken A., Ercisli S. The effects of some hormones on the callus induction in *Rosa canina* and *Rosa dumalis* *in vitro* // Atatürk Univ. Ziraat. Fak. Derg. 2001. Vol. 32, No. 2. P. 125–128.
333. Espinosa-Leal C.A., Puente-Garza C.A., García-Lara S. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds // Planta. 2018. No. 248. P. 1–18.
334. Falk K.L., Gershenzon J., Croteau R. Metabolism of monoterpenes in cell cultures of common sage (*Salvia officinalis*). I biochemical rationale for the lack of monoterpene accumulation // Plant Physiol. 1990. Vol. 93. P. 1559–1567.
335. Farhangi-sabet M., Behboodi B.S. The study of biotechnology and callus formation on *Rosa damasceana* Mill. in the Kashan region // Proceed. of IV Int. Iran and Russia conf. in agriculture and natural resources. Shahrekord, Iran, 2004. P. 91–97.
336. Feher A. Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? // Front. Plant Sci. 2019. Vol. 10. P. 536.
337. Fernandez-Guijarro B., Celestino C., Toribio M. Influence of external factors on secondary embryogenesis and germination in somatic embryos from leaves of *Quercus suber* // Plant Cell Tissue and Organ Cult. 1995. Vol. 41, No. 2. P. 99–106.
338. Figueiredo A.C., Pais M.S. *Achillea millefolium* (yarrow) cell suspension cultures: establishment and growth conditions // Biotechnology Lett. 1991. Vol. 13, No. 1. P. 63–68.
339. Figueiredo A.C., Pais M.S. Ultrastructural aspects of the glandular cell from the secretory trichomes and from the cell suspension cultures of *Achillea millefolium* L. ssp. *millefolium* // Annals of botany. 1994. Vol. 74, No. 2. P. 179–190.
340. Figueiredo A.C.S., Pais M.S., Scheffer J.J.C. Composition of the essential oil from cell suspension cultures of *Achillea millefolium* ssp. *millefolium* // Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 1995. Vol. 40, No. 2. P. 113–118.
341. Fokina A.V., Satarova T.M., Smetanin V.T., Kucenko N.I. Optimization of microclonal propagation *in vitro* of oregano (*Origanum vulgare*) // Biosyst. Divers. 2018. Vol. 26, No. 2. P. 98–102.
342. Fomenko T.I., Chumakova I.M., Kondratskaya I.P., Berdichevest L.G., Volodko I.F. Characteristic of regenerates and sorts of potato at long term cultivation *in vitro* // The Biology of Plant Cells *In Vitro* and Biotechnology: VIII Intern. conf., Saratov, 9-13 sept. 2003: abstracts. Saratov, 2003. P. 102–103.
343. Galiba G., Sutka J. A genetic study of frost resistance in wheat callus

culture // Plant Breeding. 1988. Vol. 101, No. 2. P. 132–136.

344. Gandhi K., Saravanan S. In vitro regeneration of geranium (*Pelargonium graveolens* L. Hert.) through axillary bud culture – an important essential oil yielding plant // International Journal of Scientific Research and Review. 2018. Vol. 7, No. 11. P. 17–23.

345. Garsia M.D., Molina M.C., Caso O.H. La regeneracion de plantas de maiz (*Zea mays* ssp. *mays*) a partir del cultivo de tejidos y su aplicacion en el mejoramiento genetico // Rev. fac. agron. Univ. nac. La Planta. 1992. Vol. 68, No. 1. P. 15–25.

346. García-Beltrán J.M., Esteban M.A. Properties and Applications of Plants of *Origanum Sp.* Genus. // SMJ Biol. 2016. Vol. 2(1), No. 1006. P. 1–9.

347. Gavazzi G., Tonelli C., Todesco G., Arreghini E., Raffaldi F., Vecchio F., Barbuzzi G., Biasini M.G., Sala F. Somaclonal variation versus chemically induced mutagenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) // Theor. Appl. Genet. 1987. Vol. 74, No. 6. P. 733–738.

348. Gbolade A.A., Lockwood G.B. Metabolic studies of volatile constituents in tissue cultures of *Petroselinum crispum* (Mill.) Nyman // J. Plant Physiol. 1990. Vol. 136, No. 2. P. 198–202.

349. Georgiev M., Pavlov A., Ilieva M. Rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell suspension: the effect of temperature // Biotechnol Lett. 2004. Vol. 26, No. 10. P. 855–856.

350. Georgiev M., Abrashev R., Krumova E., Demirevska K., Ilieva M., Angelova M. Rosmarinic acid and antioxidant enzyme activities in *Lavandula vera* MM cell suspension culture: A comparative study // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2009. Vol. 159, No. 2. P. 415–425.

351. Ghanbar T., Hosseini B., Jabbarzadeh Z., Farokhzad A., Sharafi A. High-frequency *in vitro* direct shoots regeneration from axillary nodal and shoot tip explants of clary sage (*Salvia sclarea* L.). // Bulg. J. Agric. Sci. 2016. Vol. 22, No. 1. P. 73–78.

352. Ghanem S.A., Sobhy A., El-Kazzaz A.A. *In vitro* regeneration of *Pelargonium graveolens* // Egyptian J. Genetic Engineering and Biotech. 2008. Vol. 6, No. 2. P. 15–18.

353. Ghiorghita G., Maftai D.E., Nicuta D. Some aspects concerning the *in vitro* reaction of *Lavandula angustigolia* L. // Propag. Orn. Plants. 2009. Vol. 9, No. 1. P. 47–49.

354. Gomes H.T., Bartos P.M., Marins A.E., De Olivera S.O., Scherwinski-Pereira J.E. Assessment of mint (*Mentha* spp) species for large-scale production of plantlets by micropropagation // Acta Scientiarum. Biological Sciences. 2015. Vol. 37, No. 4. P. 405–410.

355. Gonçalves S., Romano A. Micropropagation of *Lavandula* spp. In: Lambardi M., Ozudogru E., Jain S. (eds) Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols). 2012. Vol. 994. P. 189–198.

356. Gonçalves S., Romano A. *In vitro* culture of lavenders (*Lavandula* spp.) and the production of secondary metabolites // Biotechnology Advances. 2013. Vol. 31, No. 2. P. 166–174.

357. Gostin I. Effects of different plant hormones on *Salvia officinalis*

cultivated *in vitro* // Int. J. of Botany. 2008. Vol. 4, No. 4. P. 430–436.

358. Graham J. Lappin, Jahn D. Stride, John Tampion Biotransformation of monoterpenoids by suspension cultures of *Lavandula angustifolia* // Phytochemistry. 1987. Vol. 26, No. 4. P. 995–997.

359. Grigoriadou K., Triikka F.A., Tsoktouridis G., Krigas N., Sarropoulou V., Papanastasi K., Maloupa E., Makris A. M. Micropropagation and cultivation of *Salvia sclarea* for essential oil and sclareol production in northern Greece // In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 2020. Vol. 56. P. 51–59.

360. Grzegorzczak I., Wysokinska H. Micropropagation of *Salvia officinalis* L. by shoot tips // Biotechnologia. 2004. No. 2. P. 212–218.

361. Grzegorzczak I., Matkowski A., Wysokinska H. Antioxidant activity of extracts from *in vitro* cultures of *Salvia officinalis* L. // Food Chemistry. 2007. Vol. 104, No. 2. P. 536–541.

362. Grzegorzczak I., Wysokinska H. Liquid shoot culture of *Salvia officinalis* L. for micropropagation and production of antioxidant compounds: effect of triacontanol // Acta Societatis Botanicorum Poloniae. 2008. Vol. 77, No. 2. P. 99–104.

363. Gu X.F., Yang A.F., Meng H., Zhang J.R. *In vitro* induction of tetraploid plants from diploid *Zizyphus jujube* Mill. cv. Zhanhua // Plant Cell Rep. 2005. Vol. 24, No. 11. P. 671–676.

364. Gulati A., Jaiwal P.K. Culture conditions effecting plant regeneration from cotyledons of *Vigna radiata* (L.) Wilczek // Plant Cell, Tissue Org. Cult. 1990. Vol. 23, No. 1. P. 1–7.

365. Gulati A., Jaiwal P.K. *In vitro* selection and characterization of a callus line of *Vigna radiata* resistant to NaCl, KCl and Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> // Biologia Plantarum. 1994. Vol. 36, No. 1. P. 21–28.

366. Gupta S.D., Ahmed R. Role of inoculum weight on tissue growth and plantlet regeneration in *Triticum aestivum* L. // Indian J. Exp. Biol. 1987. Vol. 25, No. 4. P. 235–237.

367. Gupta R., Banerjee S., Mallavarapu G.R., Sharma S., Khanuja S.P.S., Shasany A.K., Kumar S. Development of a superior somaclone of rose-scented geranium and a protocol for inducing variants // Hort. Sci. 2002. Vol. 37, No. 4. P. 632–636.

368. Gupta R., Mallavarapu G.R., Banerjee S., Kumar S. Characteristics of an isomenthone-rich somaclonal mutant isolated in a geraniol-rich rose-scented geranium accession of *Pelargonium graveolens* // Flavour and Fragrance Journal. 2001. Vol. 16, No. 5. P. 319–324.

369. Gupta R., Gupta S.K., Banerjee S., Mallavarapu G.R., Kumar S. Micropropagation of elite cultivars of Rose scented Geranium (*Pelargonium graveolens* L'Herit.) for industrial production of propagules // Ind. J. Biotechnol. 2002. No. 1. P. 286–291.

370. Hamza A.M., Omaira M. Abd El-Kafie, Kasem M.M. Direct micropropagation of English lavender (*Lavandula angustifolia* Munstead) plant // J. Plant Production, Mansoura Univ. 2011. Vol. 2, No. 1. P. 81–96.

371. Harborne J.B., Williams C. Phytochemistry of the genus *Lavandula* // Lavender; the genus *Lavandula*: Medicinal and Aromatic plants / ed. M. Lis-Balchin. London, 2002. P. 86–99.

372. Hassanein A., Dorion N. Efficient plant regeneration system from leaf

discs of zonal (*Pelargonium x hortorum*) and two scented geraniums // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2005. Vol. 83, No. 2. P. 231–240.

373. Hassani B., Saboora A., Radjabian T., Husseini F.H. Somatic embryogenesis of *Ferula assa-foetida* // JSUT. 2008. Vol. 33, No. 4. P. 15–23.

374. Hitomi A., Amagai H., Ezura H. The influence of auxin type on the array of somaclonal variants generated from somatic embryogenesis of eggplant *Solanum melongena* L. // Plant Breeding. 1998. Vol. 117, No. 4. P. 379–383.

375. Hong Y.C., Read P.E., Harlander S.K., Labuza T.P. Development of a tissue culture system from immature strawberry fruits // J. Food Sci. 1989. Vol. 54, No. 2. P. 388–392.

376. Hu B.Z., Alfermann A.W. Diterpenoid production in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* // Phytochemistry. 1993. Vol. 32, No. 3. P. 699–703.

377. Huang L.D., Van Staden J. *Salvia chamelaeagnea* can be micropropagated and its callus induced to produce rosmarinic acid // S. Afr. J. Bot. 2002. Vol. 68. P. 177–180.

378. Hunault G., Desmarest P., Du Manoir J. *Foeniculum vulgare* Miller: Cell culture regeneration, and the production of anethole // Med. And Aromat. Plants 2. Berlin etc., 1989. P. 185–212.

379. Hunault G., Maatar A. Enhancement of somatic embryogenesis frequency by gibberellic acid in fennel // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 1995. Vol. 41, No. 2. P. 171–176.

380. Husaini A. M., Abdin M.Z. Interactive effect of light, temperature and TDZ on the regeneration potential of leaf discs of *Fragaria x ananassa* Duch // In Vitro Cellular and Develop. Biology – Plant. 2007. Vol. 43, No. 6. P. 576–584.

381. Hutchinson M.J., Saxena P.K. Acetylsalicylic acid enhances and synchronizes thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) tissue cultures // Plant Cell Repts. 1996. Vol. 15, No. 7. P. 512–515.

382. Ignacimuthu S., Arockiasamy S., Antonyasamy M., Ravichandran P. Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature leaf explants of *Eryngium foetidum*, a condiment // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1999. Vol. 56, No. 2. P. 131–137.

383. Ilieva M., Pavlov A. Rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell suspension culture: Nitrogen effect // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 1999. Vol. 15, No. 6. P. 711–714.

384. Ilieva-Stoilova M. P., Pavlov A.I., Kovatcheva-Apostolova E.G. Further research into *Lavandula* species. Cell cultures of *L. vera* and rosmarinic acid production // Lavender. The genus *Lavandula*. / Ed. Maria Lis-Balchin. London, New York: publ. by Taylor and Francis, 2002. P. 214–226.

385. Iola-Boldura O. M., Radu F., Popescu S., Borozan A. Regeneration, micropropagation, callus cultures and somatic embryogenesis of common sage (*Salvia officinalis* L.) // Bulletin UASVM Horticulture. 2010. Vol. 67, No. 1. P. 308–313.

386. Ishioka N., Tanimoto S. Plant regeneration from Bulgarian rose callus // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 1990. Vol. 22, No. 3. P. 197–199.

387. Ivanova E. Tissue culture of spanish chestnut (*Castanea sativa* Mill.). Growth dynamics during 35 days of cultivation // Folia dendrol. 1990. No. 17. P. 337–356.

388. Jabbarzadeh Z., Khosh-Khui M. Factors affecting tissue culture of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) // *Sci. Hort.* 2005. Vol. 105, No. 4. P. 475–482.
389. Jahan N., Mustafa R., Zaidi M.A., Mansoor A., Khan J., Baluch D. Optimization of protocol to enhance the micro propagation of Lavender species // *Current Research Journal of Biological Sciences.* 2012. Vol. 4 (3). P. 258–260.
390. Jayant Shankar Raut, Sankunny Mohan Karuppaiyil A status review on the medicinal properties of essential oils // *Industrial Crops and Products.* 2014. Vol. 62. P. 250–264.
391. Jha S., Sen S. Nuclear changes and organogenesis during callus culture of *Urginea indica* Kunth., Indian Squill // *Cytologia.* 1987. Vol. 52, No. 3. P. 433–438.
392. Jimenez V.M., Bangerth F. Relationship between endogenous hormone levels of grapevine callus cultures and their morphogenetic behaviour // *Vitis.* 2000. Vol. 39, No. 4. P. 151–157.
393. Jo U.A., Murthy H.N., Hahn E.J., Paek K.Y. Micropropagation of *Alocasia amazonica* using semisolid and liquid cultures // *In Vitro Cell. and Develop. Biology – Plant.* 2008. Vol. 44, No. 1. P. 26–32.
394. Joarder O.I., Joarder N.H., Dale P.J. *In vitro* response of leaf tissues from *Lolium multiflorum* – a comparison with leaf segment position, leaf age and *in vivo* mitotic activity // *Theor. Appl. Genet.* 1986. No. 73. P. 286–291.
395. Jordan M., Humam M., Bieri S., Christen P., Poblete E., Munoz O. *In vitro* shoot and root organogenesis, plant regeneration and production of tropane alkaloids in some species of *Schizanthus* // *Phytochemistry.* 2006. Vol. 67, No. 6. P. 570–578.
396. Junko Takeda Light – induced synthesis of anthocyanin in carrot cells in suspension. II. Effects of light and 2,4 D on induction and reduction of enzyme activities related to anthocyanin synthesis // *J. Exp. Bot.* 1990. Vol. 41, No. 227. P. 749–755.
397. Juretic B., Jelaska S. Plant developmental in long-term embryogenic callus lines of *Cucurbita pepo* // *Plant Cell Repts.* 1991. Vol. 9, No. 11. P. 623–626.
398. Kanchanapoom K., Posayapisit N., Kanchanapoom K. *In vitro* flowering from cultured nodal explants of rose (*Rosa hybrida* L.) // *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj.* 2009. Vol. 37, No. 2. P. 261–263.
399. Karam N.S., Jawad F.M., Arikat N.A., Shibl R.A. Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa* // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 2003. Vol. 73, No. 2. P. 117–121.
400. Karanova S.L. Induced mutagenesis and mutants screening in plant somatic cell culture // *Biotechnology Approaches for Exploitation and Preservation of Plant Resources: Intern. symp., Yalta, 26-31 may 2002: abstracts.* Yalta: "Крым-Фарм-Трейддинг", 2002. P. 54–55.
401. Karunatne Seetha, Santha Sunil, Kovoov A. An *in vitro* assay for drought tolerant coconut ger plasmid // *Euphytica.* 1991. Vol. 53, No. 1.. P. 25–30.
402. Kataeva N.V., Popowich E.A. Maturation and rejuvenation of *Coriandrum sativum* shoot clones during micropropagation // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 1993. Vol. 34, No. 2. P. 141–148.
403. Katagi H., Takahashi E., Nakao K., Inui M. Shootforming cultures of *Pelargonium graveolens* by jar fermentation // *Journal of Agricultural Chemical*

Society of Japan. 1986. Vol. 60, No. 1. P. 15–17.

404. Kemmerer B., Reichling J. S-adenosyl-L-methionine: Anol-O-methyltransferase activity in organ cultures of *Pimpinella anisum* // *Phytochemistry*. 1996. Vol. 42, No. 2. P. 397–403.

405. Khosh-Khui M. Biotechnology of scented Roses: a review // *International Journal of Horticultural Science and Technology* 2014. Vol. 1, No. 1. P. 1–20.

406. Kim S.W., Park M.K., Liu J. R. High frequency plant regeneration via somatic embryogenesis in cell suspension cultures of coriander (*Coriandrum sativum* L.) // *Plant Cell Repts*. 1996. Vol. 15, No. 10. P. 751–753.

407. Kim T.D., Ahn C.H., Bae K.H., Choi Y.E. The embryogenic competency and morphological changes during somatic embryogenesis in *Iris pseudacorus* // *Plant Biotech. Rep*. 2009. Vol. 3, No. 3. P. 251–257.

408. Kim H.S., Zhang G., Juvik J.A. Widholm J. M. *Miscanthus* × *giganteus* plant regeneration: effect of callus types, ages and culture methods on regeneration competence // *GCB Bioenergy*. 2010. Vol. 2, No. 4. P. 192–200.

409. Kintzios S.E. *Salvia* spp.: tissue culture, somatic embryogenesis, micropropagation and biotransformation // *Sage: The Genus Salvia* / Ed. Spiridon E. Kintzios. Publisher: CRC Press, 2000, P. 241–250.

410. Kintzios S., Papanastasiou I., Tourgelis P., Papastellatos C., Georgopoulos V., Drossopoulos J. The effects of light on callus growth and somatic embryogenesis from *Lavandula vera* and *Teucrium chamaedrys*: a preliminary study // *J. of Herbs, Spices and Medicinal Plants*. 2002. Vol. 9, No. 2-3. P. 223–227.

411. Kirimer N., Mokhtarzadeh S., Demirci B., Goger F., Khawar K. M., Demirci F. Phytochemical profiling of volatile components of *Lavandula angustifolia* Miller propagated under *in vitro* conditions // *Ind. Crop Prod*. 2017. Vol. 96. P. 120–125.

412. Koda Takatoshi, Ichi Takahito, Odake Kinnoyuke, Hideo Furuta, Jiro Sekiya Blue pigment formation by *Clerodendron trichotomum* callus // *Biosci., Biotechnol. and Biochem*. 1992. Vol. 56, No. 12. P. 2020–2022.

413. Kondic-Sipka A., Hristov N., Kobiljski B. *In vitro* screening for low temperature tolerance of wheat genotypes // *Genetica*. 2006. Vol. 38, No. 2. P. 137–144.

414. Korkor A.M., Mohamed S.A., Abd El-kafie O.M., Gohar A.A. Adaptation of the *in vitro* culture of *Origanum majorana* L. for production of phenolic acids // *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)*. 2017. Vol. 12, No. 2. P. 30–38.

415. Kornova K., Michailova J. Optimizing the rooting process in propagation of kasanlak oil-bearing rose (*Rosa damascena* Mill.) *in vitro* // *Propagation of Ornamental Plants*. 2008. Vol. 8, No. 4. P. 224–229.

416. Kovatcheva E.G., Koleva I.I., Ilieva M., Pavlov A., Mincheva M., Konushlieva M. Antioxidant activity of extracts from *Lavandula vera* MM cell cultures // *Food Chemistry*. 2001. Vol. 72, No. 3. P. 295–300.

417. Kulkarni R.N., Mallavarapu G.R., Baskaran K., Ramesh S., Kumar S. Composition of the essential oils of two isomenthone-rich variants of geranium (*Pelargonium* sp.) // *Flavour and Fragrance Journal*. 1998. Vol. 13, No. 6. P. 389–392.

418. Kulpa D., Wesołowska A., Jadczyk P. Micropropagation and composition of essential oils in garden Thyme (*Thymus vulgaris* L.) // *Not. Bot.*

- Horti. *Agrobo*. 2018. Vol. 46, No. 2. P. 525–532.
419. Kumar K.B., Pareek N., Pillai S.K., Pillai A. Callus development, shoot formation and somatic embryogenesis in *Coriandrum* L. *in vitro* // *Beitr. Biol. Pflanz*. 1982. Vol. 57, No. 3. P. 369–376.
420. Kumar S., Singh M.P. *Plant tissue culture* / Published by S. B. Nangia. New Delhi (India): Balaji Offset, 2009. 310 p.
421. Kumar A., Chakraborty A., Ghanta S., Chattopadhyay S. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of mint with *E. coli* glutathione synthetase gene // *Plant Cell Tiss. Organ Cult*. 2009. Vol. 96. P. 117–126.
422. Kumar P.S., Kumari B.D.R. Effect of amino acid and growth regulators on indirect organogenesis in *Artemisia vulgaris* L. // *Asian J. of Biotechnology*. 2010. Vol. 2, No. 1. P. 37–45.
423. Kumar A. Palni L.M.S. The effect of light source and gelling agent on micropropagation of *Rosa damascena* Mill. and *Rhynchosytilis retusa* (L.) Bl. // *J. of Horticultural Science and Biotechnology*. 2015. Vol. 78, No. 6. P. 786–792.
424. Kuriyama A., Watanabe K., Yamana M. Effect of glycine and leucine on the recovery of frozen-thawed *Lavandula vera* cells // *Cryo Letters*. 2000. Vol. 21, No. 3. P. 157–162.
425. Kuusiene S., Kandzezauskaite M. The influence of genotype and explant for callus induction and proliferation of *Rosa floribunda* // *Acta Hort. (ISHS)*. 2001. No. 560. P. 501–508.
426. Kuźma L., Bruchajzer E., Wysokińska H. Diterpenoid production in hairy root culture of *Salvia sclarea* L. // *Z. Naturforsch C*. 2008. Vol. 63, No. 7-8. P. 621–624.
427. Lakshmana Rao P.V. *In vitro* plant regeneration of scented-leaved geranium *Pelargonium graveolens* // *Plant Science*. 1994. Vol. 98, No. 2. P. 193–198.
428. Langhansova L., Konradova H., Vanek T. Polyethylene glycol and abscisic acid improve maturation and regeneration of *Panax ginseng* somatic embryos // *Plant Cell Rep*. 2004. Vol. 22, No. 10. P. 725–730.
429. Larkin P.J., Scowcroft W.R. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement // *Theor. Appl. Genet*. 1981. Vol. 60. P. 197–214.
430. Leelavathi D., Govinda Raju M.V., Yashoda, Narendra Kuppan The effect of growth regulators on shoot initiation, multiplication and rooting of lavender (*Lavandula angustifolia* L.) – an significant medicinal plant // *Journal of Pharmaceutical Biology*. 2014. Vol. 4, No. 2. P. 66–70.
431. Li-Min Han, Jia-Ning Yu, Wen-Feng Ju Salt and drought tolerance of transgenic *Salvia miltiorrhiza* Bunge with the TaLEA1 Gene // *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Bao*. 2007. Vol. 33, No. 2. P. 109–114. [Электронный ресурс]. URL: <http://han.lm.lib.bioinfo.pl/auth:Han,LM>.
432. Liu W., Chilcott C.E., Reich R.C., Hellmann G.M. Regeneration of *Salvia sclarea* via organogenesis // *In Vitro Cell.Dev.Biol. Plant*. 2000. Vol. 36, No. 3. P. 201–206.
433. Liu J.R., Kim S.W., Oh S.C. *In vitro* culture and the production of secondary metabolites in *Coriandrum sativum* L. (Coriander) // *Biotechnology in agricultural and forestry 51. Medicinal and aromatic plants XII*; / Eds. T. Nagata and Y. Ebizuka. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2002. P. 13–22.

434. Lo Cantore P., Iacobellis N.S., De Marco A., Capasso F., Senatore F. Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller Var. vulgare (Miller) essential oils // J. Agric. Food Chem. 2004. Vol. 52, No. 26. P. 7862–7866.
435. Lourenco P.M.L., Figueiredo A.C., Barroso J.G., Pedro L.G., Oliveira M.M., Deans S.G., Scheffer J.J.C. Essential oils from hairy root cultures and from plant roots of *Achillea millefolium* // Phytochemistry. 1999. Vol. 51, No. 5. P. 637–642.
436. Lucchesini M., Pacifici S., Tognoni F., Mensuali-Sodi A., Serra G. Optimisation of *in vitro* cultural conditions of some officinal species // Acta Hort. 2006. No. 723. P. 6–10.
437. Lukoseviciute V., Rugienius R., Kavaliauskaite D. Investigation of strawberry hardening in low temperatures *in vitro* // Scientific works of the Lithuanian Institute of horticulture and Lithuanian University of agriculture. Sodininkyste ir darzininkyste. 2007. Vol. 26, No. 3. P. 274–281.
438. Madhulika Singh, Uma Jaiswal, Vijai Shanker Jaiswal *In vitro* selection of NaCl-tolerant callus lines and regeneration of plantlets in a bamboo (*Dendrocalamus strictus* Ness.) // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2003. Vol. 39, No. 2. P. 229–233.
439. Makunga N.P., Van Staden J. An efficient system for the production of clonal plantlets of the medicinally important aromatic plant: *Salvia africana-lutea* L. // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2008. Vol. 92, No. 1. P. 63–72.
440. Marconi P. L., López M. C., De Meester J., Bovjin C., Alvarez M.A. *In vitro* establishment of *Salvia hispanica* L. plants and callus // Biotecnología Vegetal. 2013. Vol. 13, No. 4. P. 203–207.
441. Martin R., Reichling J. NIH-shift during biosynthesis of epoxy-pseudoisoeugenol (2-methylbutyrate) in tissue cultures of *Pimpinella anisum* // Phytochemistry. 1992. Vol. 31, No. 2. P. 511–514.
442. Martinelli L., Scienza A., Villa P., Deponti P., Gianazza E. Enzyme markers for somatic embryogenesis in *Vitis* // J. Plant Physiol. 1993. Vol. 141, No. 4. P. 476–481.
443. Martínez O. Selection of Molecular Markers for the Estimation of Somaclonal Variation. In: Plant cell culture protocols (4<sup>th</sup> edition) / Eds.: V.M. Loyola-Vargas, N. Ochoa-Alejo. New York, NY: Humana Press, 2018. P. 103–129.
444. Mascarello C., Mantovani E., Ruffoni B. *In vitro* culture of several ornamental and medicinal *Salvia* species // Acta Hort. (ISHS). 2006. No. 723. P. 375–380.
445. May R.A., Sink K.C. Genotype and auxin influence direct somatic embryogenesis from protoplasts derived from embryogenic cell suspensions of *Asparagus officinalis* L. // Plant Sci. 1995. Vol. 108, No. 1. P. 71–84.
446. Matheka J.M., Magiri E., Rasha A.O., Machuka J. *In vitro* selection and characterization of drought tolerant somaclones of tropical maize (*Zea mays* L.) // Biotechnology. 2008. Vol. 7, No. 4. P. 641–650.
447. Mathew R., Sankar D.P. Comparison of somatic embryo formation in *Ocimum basilicum* L., *Ocimum sactum* L., *Ocimum gratissimum* L. // International Journal of Pharma and Bio Sciences. 2011. Vol. 2, No. 1. P. 356–367.
448. Meftahzade H., Moradkhani H., Naseri B., Lofti M., Naseri A. Improved *in vitro* culture and micropropagation of different *Melissa officinalis* L.

- genotypes // J. of Medicinal Plants Research. 2010. Vol. 4, No. 3. P. 240–246.
449. Menoret Y., Vladescu B., Desmarest P. Biotechnologies et aromes // C. R. Acad. Agr. Fr. 1988. Vol. 74, No. 7. P. 57–66.
450. Mirzaei S., Zare A.G., Jafary S. Evaluating Micropropagation of Kashan Damask Rose, Yasooj Aromatic Rose and Their Hybrid // International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology. 2019. Vol. 4, No. 5. P. 1407–1413.
451. Mistic D., Grubisic D., Konjevic R. Micropropagation of *Salvia brachyodon* through nodal explants // Biologia Plantarum. 2006. Vol. 50, No. 3. P. 473–476.
452. Mithila J., Hall J.C., Victor J.M.R., Saxena P.K. Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) // Plant Cell Rep. 2003. Vol. 21, No. 5. P. 408–414.
453. Mitrofanova O.V., Grebennikova O.A., Paliy A.E., Brailko V.A., Mitrofanova I.V. Biochemical and physiological features of regenerants in some lavender and lavandin cultivars *in vitro* // Plant Cell Biotechnol. Mol. Biol. 2016. Vol. 17, No. 7-8. P. 335–341.
454. Mitrofanova I.V., Grebennikova O.A., Brailko V.A., Paliy A.E., Marko N., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Mitrofanova O.V. Physiological and biochemical features of some cultivars in essential oil rose (*Rosa × damascena* Mill.) growing *in situ* and *in vitro* // Int. J. PharmTech Res. 2016. Vol. 9, No. 7. P. 226–232.
455. Mitrofanova I.V., Chirkov S.N., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Chelombit S.V., Zakubanskiy A.V., Rabotyagov V.D., Mitrofanova O.V. Micropropagation of *Lavandula angustifolia* Mill. 'Record' and 'Belyanka' // Acta Hort. 2017. No. 1187. P. 37–45.
456. Mitrofanova I.V., Brailko V.A., Ivanova N.N., Mitrofanova O.V. Some special features of the conservation of valuable, essential oil rose cultivars: *in vitro* deposition and cryopreservation // Acta Hort. 2019. No.1234. P. 195–201.
457. Mitrofanova I.V., Smykov A.V., Mitrofanova O.V., Lesnikova-Sedoshenko N.P., Chirkov S.N., Zhdanova I.V. Using *in vitro* embryo culture for obtaining new breeding forms of peach // Acta Hort. ISHS. 2020. No. 1289. P. 159–165.
458. Miura Y., Fukui H., Tabata M. Clonal propagation of chemically uniform fennel plants through somatic embryos // Planta Med. 1987. Vol. 53, No. 1. P. 92–94.
459. Modos K., Maroti M. Experiment for establishment of geranium callus culture // Bot. Kozlem. 1979. Vol. 66, No. 4. P. 313–317.
460. Moeller E.L. Induction of autotetraploidy and characterization of the effects of genome duplication on native ornamental species *Monarda punctata* and *Monarda fistulosa* (Lamiaceae): A thesis for the degree of master of science in plant agriculture. Guelph, Ontario, Canada, 2015. 119 p.
461. Mohamed S.V., Sung J.M., Jeng T.L., Wang C.S. Optimization of somatic embryogenesis in suspension cultures of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) – a hardy grain legume // Sci. Hort. 2005. Vol. 106. P. 427–439.
462. Mohamed G.R.A., Khusnetdinova L.Z., Timofeeva O.A. Elaboration of Micropropagation Protocol for *Vaccinium corymbosum* cv. "Sunt Blue Giant" //

Asian Journal of Plant Science and Research. 2018. Vol. 8, No. 5. P. 1–11.

463. Mohan Jain S. Tissue culture-derived variation in crop improvement // *Euphytica*. 2001. Vol. 18. P. 153–166.

464. Mokhtarzadeh S., Demirci B., Agalar H.G., Khawar K.M., Kirimer N. *In vitro* propagation and volatile compound characterization of *Lavandula stoechas* L. subsp. *Stoechas* – an economically important source of essential oil // *Records of Natural Products*. 2019. Vol. 13, No. 2. P.121–128.

465. Moon H.R., Park S.Y., Kim Y.W., Kim S.H. Somatic embryogenesis and plantlet production using rejuvenated tissues from serial grafting of a mature *Kalopanax septemlobus* tree // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 2008. Vol. 44, No. 2. P. 119–127.

466. Mozafari A.A., Vafae Y., Karami E. *In vitro* propagation and conservation of *Satureja avromanica* Maroofi – an indigenous threatened medicinal plant of Iran // *Physiol. Mol. Biol. Plants*. 2015. Vol. 21, No. 3. P. 433–439.

467. Mujib A. Colchicine induced morphological variants in pineapple // *Plant Tissue Cult. And Biotech*. 2005. Vol. 15, No. 2. P. 127–133.

468. Munoz-Bertomeu J., Arrillaga I., Ros R., Segura J. Up-regulation of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase enhances production of essential oils in transgenic spike lavender // *Plant Physiol*. 2006. Vol. 142, No. 3. P. 890–900.

469. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant*. 1962. Vol. 15, No. 3. P. 473–497.

470. Murashige T. Plant propagation through tissue culture // *Ann. Rev. Plant Physiol*. 1974. Vol. 25. P. 135–168.

471. Murthy B.N.S., Singh R.P., Saxena P.K. Induction of high-frequency somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey cv. Ringo Roso) cotyledonary cultures // *Plant Cell Repts*. 1996. Vol. 15, No. 6. P. 423–426.

472. Murthy H.N., Hahn E.J., Paek K.Y. Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration in *Coriandrum sativum* L. // *Scientia Hort*. 2008. Vol. 118, No. 2. P. 168–171.

473. Nagatomi S., Degi K. Mutation breeding of Chrysanthemum by gamma field irradiation and *in vitro* culture // *Induced plant mutations in the Genomics Era. Food and Agriculture Organization of the United Nations / Ed. Q.Y. Shu. Rome, 2009. P. 258–261.*

474. Nakajima H., Sonomoto K., Sato F., Yamada Y., Tanaka A. Pigment synthesis by immobilized cultured cells of *Lavandula vera* and characterization of a component of the pigments // *Agric. Biol. Chem*. 1990. Vol. 54, No. 1. P. 53–60.

475. Nakamura M., Natsume M., Kishie Y., Yagi Y. Essential oil production by tissue culture of rose geranium (*Pelargonium graveolens*) // *Scientific Reports of the Faculty of Agriculture, Meijo University*. 2002. No. 38. P. 15–22.

476. Nalawade S.M., Tsay H.S. *In vitro* propagation of some important Chinese medicinal plants and their sustainable usage // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*. 2004. Vol. 40, No. 1. P. 143–154.

477. Namrata Dagli, Rushabh Dagli, Rasha Said Mahmoud, Kusai Baroudi. Essential oils, their therapeutic properties, and implication in dentistry: A review // *J. Int Soc Prev Community Dent*. 2015. Vol. 5 (5). P. 335–340.

478. Nassour M., Dorion N. Plant regeneration from protoplasts of micropropagated *Pelargonium × hortorum* ‘Alain’: effect of some environmental

and medium factors on protoplast system efficiency // Plant Science. 2002. Vol. 163, No. 1. P. 169–176.

479. Nebauer S.G., Arrillaga I., del Castillo-Agudo L., Segura J. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of the aromatic shrub *Lavandula latifolia* // Mol. Breed. 2000. No. 6. P. 593–552.

480. Neumann K.H., Kumar A., Sopory S.K. Recent Advances In Plant Biotechnology And Its Applications / Eds. A. Kumar, S.K. Sopory. New Delhi: Intern. Publ. House Pvt. Ltd., 2008. 694 p.

481. Nicuța D. Aspects concerning the morphogenetic reaction of some explants of *Lavandula stoechas* ‘Anouk’ cultivated *in vitro* // Studii și Cercetări. Biologie. Universitatea “Vasile Alecsandri” din Bacău. 2017. Vol. 26, No. 1. P. 19–23.

482. Nikšić H., Kovač-Bešović E., Makarević E., Durić K., Kusturica J., Muratovic S. Antiproliferative, antimicrobial, and antioxidant activity of *Lavandula angustifolia* Mill. essential oil // Journal of Health Sciences. 2017. Vol. 7, No. 1. P. 35–43.

483. Nirmal Babu K., Mino D., Geetha S.P., Samsudeen K., Rema J., Ravindran P.N., Peter K.V. Plant biotechnology – its role in improvement of spices // Indian J. of Agricultural Sciences. 1998. Vol. 68, No. 8. P. 539–547.

484. Negi P.S., Biswas V.R., Verma S., Kumar N. Anew protocol for micropropagation of rose geranium (*Pelargonium graveolens*) // Progressive Horti. 2004. Vol. 36 (1). P. 31–34.

485. Noodezh H.M., Moieni A., Baghizadeh A. *In vitro* propagation of the Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2012. Vol. 48, No. 6. P. 530–538.

486. Ochatt S. J., Marconi P.L., Radice S., Arnozis P.A., Caso O.H. *In vitro* recurrent selection of potato: production and characterization of salt tolerant cell lines and plants // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1999. Vol. 55, No. 1. P. 1–8.

487. Onisei T., Toth E.T., Amariei D. Stem callus formation and floriferous bud plant regeneration of *Lavandula angustifolia* Mill. // An. St. Univ. Iasi (Biol.). 1989. Vol. 35, No. 1. P. 45–49.

488. Onisei T. Rapid clonal propagation of scented geranium // An. Sti. Univ. Sec.2. 1993. No. 39. P. 125–127.

489. Otiș R. Perbanyakan tanaman anis (*Pimpinella anisum* L.) secara *in vitro* // Bul. Littro. 2007. Vol. 18, No. 2. P. 117–126.

490. Panaia M., Senaratna T., Dixon K. W., Sivasithamparam K. The role of cytokinins and thidiazuron in the stimulation of somatic embryogenesis in key members of the *Restionaceae* // Australian J. of Botany. 2004. Vol. 52, No. 2. P. 257–265.

491. Panda H. Handbook on Spices and Condiments (Cultivation, Processing and Extraction). Publisher: Asia Pacific Business Press Inc., 2010. 640 p. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.niir.org/books/book/handbook-on-spices-condiments-cultivation-processing-extraction-h-panda/isbn-9788178331324/zb,,177,a,0,0,a/index.html>

492. Panizza M., Tognoni F. Clonal propagation, callus formation and plant regeneration of lavandin // Sci. Hort. 1988. Vol. 37, No. 1-2. P. 157–163.

493. Papafotiou M., Martini A.N. Effect of position and orientation of leaflet explants with respect to plant growth regulators on micropropagation of

- Zamioculcas zamiifolia* Engl. (ZZ) // Sci. Hort. 2009. Vol. 120, No. 1. P. 115–120.
494. Park C.H., Kumar P.S., Walton P.D. Male sterile variants in a tissue culture regenerated population of *Elymus canadensis* // Amer. J. Bot. 1989. Vol. 76, No. 6. P. 156.
495. Park S.U., Uddin M.R., Xu H., Kim Y.K., Lee S.Y. Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant // African J. of Biotechnology. 2008. Vol. 7, No. 25. P. 4959–4965.
496. Patel D.B., Barve D.M., Mehta A.R. Regeneration of pigeonpea, *Cajanus cajan*, through somatic embryogenesis // Indian J. Exp. Biol. 1994. Vol. 32, No. 10. P. 740–744.
497. Pati P. Sharma M., Ahuja P. Micropropagation, protoplast culture and its implications in the improvement of scented rose // Acta. Hort. (ISHS). 2001. Vol. 547. P. 147–158.
498. Pavlov A.I., Georgiev M.I., Ilieva M.P. Production of rosmarinic acid by *Lavandula vera* MM cell suspension in bioreactor: effect of dissolved oxygen concentration and agitation // World Journal of Microbiology and Biotechnology. 2005. Vol. 21, No. 4. P. 389–392.
499. Pedrosa M.C., Primikiriros N., Roubelakis-Angelakis K.A., Pais M.S. Free and conjugated polyamines in embryogenic and non-embryogenic leaf regions of camellia leaves before and during direct somatic embryogenesis // Physiologia Plantarum. 1997. Vol. 101, No. 1. P. 213–219.
500. Phatak S.V., Heble M.R. Organogenesis and terpenoid synthesis in *Mentha arvensis* // Fitoterapia. 2002. Vol. 73, No. 1. P. 32–39.
501. Phelan S., Hunter A., Douglas G.C. Effect of explants source on shoot proliferation and adventitious regeneration in 10 *Buddleia* cultivars // Sci. Hort. 2009. Vol. 120, No. 4. P. 518–524.
502. Pillai S.K., Hildebrandt A.C. Induced differentiation of Geranium plants from undifferentiated callus *in vitro* // Am. J. Bot. 1969. Vol. 56, No. 1. P. 52–58.
503. Pinto D.L.P., de Almeida Barros B., Viccini L.F., de Campos J.M.S., da Silva M.L., Otoni W.C. Ploidy stability of somatic embryogenesis-derived *Passiflora cincinnata* Mast. plants as assessed by flow cytometry // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2010. Vol. 103, No. 1. P. 71–79.
504. Pisseri F., Bertoli A., Pistelli L. Essential oils in medicine: principles of therapy // Parassitologia. 2008. Vol. 50 (1-2). P. 89–91.
505. Plant cell culture protocols (4th edition) / Eds.: V.M. Loyola-Vargas, N. Ochoa-Alejo]. New York, NY: Humana Press, 2018. 507 p.
506. Popova E., Kim H.H., Paek K.Y. Cryopreservation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) somatic embryos using sucrose preculture and air desiccation // Scientia Hort. 2010. Vol. 124, No. 4. P. 522–528.
507. Pretova A., Dedicova B. Somatic embryogenesis in *Solanum tuberosum* L. cv. Desiree from unripe zygotic embryos // J. Plant Physiol. 1992. Vol. 139, No. 5. P. 359–372.
508. Rabuma T. *In vitro* propagation of geranium (*Pelargonium graveolens* L.) from nodal culture // Research and Reviews: Journal of Agricultural Science and Technology. 2015. Vol. 4, No. 2. P. 23–34.
509. Radha R.K., Varghese A.M., Seeni S. Conservation through *in vitro* propagation and restoration of *Mahonia leschenaultii*, an endemic tree of the

Western Ghats // Science Asia. 2013. Vol. 39. P. 219–229.

510. Radojevic L., Subotic A. Plant regeneration of *Iris setosa* Pall. through somatic embryogenesis and organogenesis // J. Plant Physiol. 1992. Vol. 139, No. 6. P. 690–696.

511. Rai M.K., Kalia R.K., Singh R., Gangola M.P., Dhawan A.K. Developing stress tolerant plants through in vitro selection – An overview of the recent progress // Environmental and Experimental Botany. 2011. Vol. 71 (1). P. 89–98.

512. Rajeshwari C.U., Abirami M., Andallu B. *In vitro* and *in vivo* antioxidant potential of aniseeds (*Pimpinella anisum*) // Asian J. Exp. Biol. Sci. 2011. Vol. 2, No. 1. P. 80–89.

513. Ram M., Prasad K.V., Kaur C., Singh S.K., Arora A., Kumar S. Induction of anthocyanin pigments in callus cultures of *Rosa hybrida* L. in response to sucrose and ammonical nitrogen levels // Plant Cell Tiss Organ Cult. 2011. Vol. 104. P. 171–179.

514. Ramirez-Mosquedo M.A., Iglesias-Andreu L.G., Bautista-Aguilar J.R. The effect of light quality on growth and development of in vitro plantlet of *Stevia rebaudiana* Bertoni. // Sugar Tech. 2017. Vol. 19, No. 3. P. 331–336.

515. Rashmi P.T., Manjushri A.D. Clonal propagation of different cultivars of *Pelargonium graveolens* (L' Herit.) viz., Reunion, Bourbon and Egyptian // Biotech. 2010. Vol. 9. P. 492–498.

516. Ravindra N.S., Kulkarni R.N., Gayathri M.C., Ramesh S. Somaclonal variation for some morphological traits, herb yield, essential oil content and essential oil composition in an Indian cultivar of rose-scented geranium // Plant Breeding. 2004. Vol. 123, No. 1. P. 84–86.

517. Razdan M.K. Introduction to plant tissue culture. Science publishers, Inc., Enfield, NH, USA, 2002. 370 p.

518. Reichling J., Martin R., Kemmerer B. Biosynthesis of pseudoisoeugenol-derivatives in liquid tissue cultures of *Pimpinella anisum* // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1995. Vol. 43, No. 2. P. 131–136.

519. Remotti P. C. Somaclonal variation and *in vitro* selection for crop improvement // Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement / Eds: S. Mohan Jain, D.S. Brar, B.S. Ahloowalia. Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 1998 P. 169–202.

520. Rinki Verma, Singh R.R. Regeneration and *in vitro* flowering in *Brassica campestris* (L.) Var. Bhavani // Our Nature. 2007. No. 5. P. 21–24.

521. Robertson D., Earle E.D., Mutschler M.A. Increased totipotency of protoplasts from *Brassica oleracea* plants previously regenerated in tissue culture // Plant. Cell Tissue Organ Cult. 1988. Vol. 14, No. 1. P. 15–24.

522. Rostiana O. Perbanyakan tanaman anis (*Pimpinella anisum* L.) secara *in vitro* // Bul. Littro. 2007. Vol. 18, No. 2. P. 117–126.

523. Rout G.R., Das G., Samantaray S., Das P. *In vitro* micropropagation of *Lawsonia inermis* (Lythraceae) // Rev. biol. trop. 2001. Vol. 49, No. 3-4. P. 957–963.

524. Rózsalski M., Kuźma L., Krajewska U., Wysokińska H. Cytotoxic and proapoptotic activity of diterpenoids from *in vitro* cultivated *Salvia sclarea* roots. Studies on the leukemia cell lines // Z. Naturforsch C. 2006. Vol. 61, No. 7-8. P. 483–488.

525. Ruffoni B., Raffi D., Rizzo A., Oleszek W., Giardi M.T., Bertoli A.,

Pistelli L. Establishment of *in vitro* *Salvia* cell biomass for the controlled production of antioxidant metabolites // *Acta Hort.* 2009. No. 829. P. 423–427.

526. Ruffoni B., Savona M., Capponi A., Campagna G., Cervelli C. Micropropagation of *Salvia pratensis* L. and *Salvia nemorosa* L. accessions selected for ornamental characters // *Acta Hort.* 2009. No. 812. P. 201–204.

527. Rugienius R., Stanys V. *In vitro* screening of strawberry plants for cold resistance // *Euphytica.* 2001. Vol. 122, No. 2. P. 269–277.

528. Rugienius R., Stanys V., Staniene G., Siksnianas T., Gelvonauskiene D., Gelvonauskis B. *In vitro* culture and evaluation peculiarities of different fruit and berry plant genotypes in various period of ontogenesis // *Biologia.* 2003. No. 1. P. 81–86.

529. Sahraroo A., Babalar M., Mirjalili M.H., Moghaddam M.R.F., Ebrahimi S.N. *In-vitro* callus induction and rosmarinic acid quantification in callus culture of *Satureja khuzistanica* Jamzad (Lamiaceae) // *Iranian J. of Pharmaceutical Research.* 2014. Vol. 13 (4). P. 1447–1456.

530. Saini R., Jaiwal P.K. Age, position in mother seedling, orientation, and polarity of the epicotyl segments of blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper) determines its morphogenic response // *Plant Science.* 2002. Vol. 163, No. 1. P. 101–109.

531. Salekjalali M. Phloroglucinol, BAP and NAA enhance axillary shoot proliferation and other growth indicators *in vitro* culture of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) // *American-Eurasian J. Agric. And Environ. Sci.* 2012. Vol. 12, No. 7. P.960–966.

532. Santos P.M., Figueiredo A.C., Oliveira M.M., Barroso J.G., Pedro L.G., Deans S., Younus A.K.M., Scheffer J. Essential oils from hairy root cultures and from fruits and roots of *Pimpinella anisum* // *Phytochemistry.* 1998. Vol. 48, No. 3. P. 455–460.

533. Santos-Gomes P.C., Fernandes-Ferreira M. Essential oils produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.) // *J. Agric. Food Chem.* 2003. Vol. 51, No. 8. P. 2260-2266.

534. Santos-Gomes P.C., Seabra R.M., Andrade P.B., Fernandes-Ferreira M. Determination of phenolic antioxidant compounds produced by calli and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.) // *J. Plant Physiol.* 2003. Vol. 160, No. 9. P. 1025–1032.

535. Saxena G., Banerjee S., Rahman L., Mallavarapu G.R., Sharma S., Kumar S. An efficient *in vitro* procedure for micropropagation and generation of somaclones of rose scented *Pelargonium* // *Plant Science.* 2000. Vol. 155, No. 2. P. 133–140.

536. Saxena G., Banerjee S., Laiq-ur-Rahman, Verma P.Ch., Mallavarapu G.R., Kumar S. Rose-scented geranium (*Pelargonium* sp.) generated by *Agrobacterium rhizogenes* mediated Ri-insertion for improved essential oil quality // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 2007. Vol. 90, No. 2. P. 215–223.

537. Saxena S.N., Khan I.U., Saxena R. Organogenesis in anise (*Pimpinella anisum* L.) // *Journal of Spices and Aromatic Crops.* 2011. Vol. 21, No. 1. P. 59–63.

538. Saxena G., Laiq-ur-Rahman, Verma P. Ch., Banerjee S., Kumar S. Field performance of somaclones of rose scented geranium (*Pelargonium graveolens* L'Her Ex Ait.) for evaluation of their essential oil yield and composition // *Industrial Crops and Products.* 2008. Vol. 27, No. 1. P. 86–90.

539. Saxena G. Verma P. Ch., Rahman Laiq-ur, Banerjee S., Shukla R.S., Kumar S. Selection of leaf blight-resistant *Pelargonium graveolens* plants regenerated from callus resistant to a culture filtrate of *Alternaria alternata* // Crop Protection. 2008. Vol. 27, No. 3-5. P. 558–565.
540. Saxena S.N., Ishan K.U., Saxena R. Organogenesis in anise (*Pimpinella anisum* L.) // Journal of Spices and Aromatic Crops. 2012. Vol. 21, No. 1. P. 59–63.
541. Schreier P. Biotechnology and flavour production // Proc. VIII Intern. biotechnol. symp., Vol. 2, Paris, 1989. P. 869–882.
542. Segura J., Calvo M.C. *Lavandula* spp. (Lavender): *in vitro* culture, regeneration of plants and the formation of essential oil and pigments // Biotechnology in Agriculture and Forestry / Ed. Bajaj Y.P.S. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1991. P. 283–310.
543. Sehgal C.B. Experimental induction of zygotic multiple embryos in *Coriandrum sativum* L. // Indian J. Expt. Biol. 1972. No. 10. P. 457–459.
544. Shao-Hua Zeng, Chuan-Wu Chen, Liu Hong, Ji-Hong Liu, Xiu-xin Deng *In vitro* induction, regeneration and analysis of autotetraploids derived from propoplasts and callus treated with colchicine in *Citrus* // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2006. Vol. 87, No. 1. P. 85–93.
545. Shakti Mehrotra, Manoj Kumar Goel, Arun Kumar Kukreja, Bhartendu Nath Mishra Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization // African Journal of Biotechnology. 2007. Vol. 6, No. 13. P. 1484–1492.
546. Sharp W.R., Sondahl M.R., Caldas L.S., Marraffa S.B. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis // Hort. Rev. 1980. Vol. 2. P. 268–310.
547. Sheeja T.E., Asit B. Mandal *In vitro* flowering and fruiting in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) // AsPac. J. Mol. Biol. Biotechnol. 2003. Vol. 11, No. 1. P. 37–42.
548. Shen X., Chen J., Kane M. E., Henny R. J. Assessment of somaclonal variation in *Dieffenbachia* plants regenerated through indirect shoot organogenesis // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2007. Vol. 91, No. 1. P. 21–27.
549. Sinski I., Dal Bosco D., Pierozzi N. I., Maia J.D.G., Ritschel P.S., Quecini V. Improving *in vitro* induction of autopolyploidy in grapevine seedless cultivars // Euphytica. 2014. Vol. 196. P.299–311.
550. Skala E., Wysokinska H. *In vitro* regeneration of *Salvia nemorosa* L. from shoot tips and leaf explants // In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 2004. Vol. 40, No. 6. P. 596–602.
551. Skirvin R.M., Janick J. Tissue culture-induced variation in scented *Pelargonium* spp. // J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1976. Vol. 101, No. 3. P. 281–290.
552. Slavova Y., Zayova E., Krastev S. Polyploidization of Lavender (*Lavandula vera* V.) *in vitro* // Bulg. J. Agric. Sci. 2004. No. 10. P. 329–332.
553. Sodi A. M., Serra G., Vitaglino C., Blando F. *In vitro* growth pattern of salt-stressed cells of lavandin // Acta Hort. 1990. No. 280. P. 459–462.
554. Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications / Eds Loyola-Vargas V., Ochoa-Alejo N. Springer, Cham, 2016. 506 p.
555. Soni D.R., Sayyad F.G., Sodhi G.K. Micropropagation studies in *Lavandula angustifolia* // Bioscience, Bioengineering and Biotechnology. 2014. Vol. 1. P. 07–10.

556. Sowik I., Wawrzynczak D., Michalczuk L. Selection of strawberry somaclonal variants with increased tolerance to diseases // Growth and development of plants. Theoretical and practical problems: Intern. scientific conf. Lithuanian Institute of Horticulture, Babtai, 7-9 june 2004: abstracts. Babtai, 2004. P. 13.
557. Srinivas L., Ganapathi T.R., Suprasanna P., Bapat V.A. Desiccation and ABA treatment improves conversion of somatic embryos to plantlets in banana (*Musa spp.*) cv. Rasthali (AAB) // Indian J. of Biotechnology. 2006. Vol. 5. P. 521–526.
558. Stanev S., Zagorcheva T., Atanassov I. Lavender cultivation in Bulgaria – 21<sup>st</sup> century developments, breeding challenges and opportunities // Bulgarian Journal of Agricultural Science. 2016. Vol. 22, No. 4. P. 584–590.
559. Stephen R., Jayabalan N. *In vitro* flowering and seed setting formation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) // Current science. 1998. Vol. 4, No. 3. P. 195–197.
560. Stephen R., Jayabalan N. Artificial seed production in coriander (*Coriandrum sativum* L.) // Plant Tissue Cult. 2000. Vol. 10, No. 1. P. 45–49.
561. Stephen R., Jayabalan N. Propagation of *Coriandrum sativum* L. through somatic embryogenesis // Indian J. of Exp. Biology. 2001. Vol. 39, No. 4. P. 387–389.
562. Sukhumpinij P., Kakihara F., Kato M. *In vitro* regeneration from mature leaf explants of *Pelargonium rapaceum* (L.) L’Hérit // Sci. Hort. 2010. Vol. 126, No. 3. P. 385–389.
563. Suprasanna P., Ganapathi T.R., Rao P.S. Embryogenic ability in long term callus cultures of rice (*Oryza sativa* L.) // Cereal Res. Commun. 1997. Vol. 25, No. 1. P. 27–33.
564. Suprasanna P., Choudhary R.S., Desai N.S., Bapat V.A. Regulation of somatic embryogenesis by plant growth regulators in sugarcane // Sugar Tech. 2005. Vol. 7, No. 4. P. 123–128.
565. Tabori K.M., Dobranszki J., Iszaly-Toth J., Hudak I. Effect of osmotic stress on *in vitro* shoot culture of peas (*Pisum sativum*) // Acta. Hort. 2009. No. 812. P. 231–236.
566. Tantau H., Dorffling K. *In vitro* selection of proline overproducing cell lines of winter wheat with increased frost tolerance // Physiol. Plant. 1990. Vol. 79, No. 2. P. 104–109.
567. Tawfik A.A., Mohamed M.F. Shoot differentiation and plant regeneration from thidiazuron-induced callus of *Salvia officinalis* // Acta Hortic. 2006. No. 723. P. 309–314.
568. Tawfik A.A., Mohamed M.F. Regeneration of salvia (*Salvia officinalis* L.) via induction of meristematic callus // In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 2007. Vol. 43, No. 1. P. 21–27.
569. Teixeira da Silva J.A., Bolibok H., Rakoczy-Trojanowska M. Molecular markers in micropropagation, tissue culture and *in vitro* plant research // Genes, Genomes and Genomics. 2007. Vol. 1 (1). P. 66–72.
570. Tembe R.P., Deodhar M.A. Clonal propagation of different cultivars of *Pelargonium graveolens* (L’Herit.) viz., Reunion, Bourbon and Egyptian // Biotechnology. 2010. No. 9. P. 492–498.
571. Teshome I., Teshome S., Soromessa T., Feyissa T. Development of an efficient *in vitro* propagation protocol for *Satureja punctata* – A rare aromatic and

medicinal plant // Taiwania. 2016. Vol. 61 (1). P.41–48.

572. Theiler-Hedtrich R., Kagi A.C. Cloning *in vitro* and somatic embryogenesis in *Foeniculum vulgare* Mill. (fennel) of “ZEFA FINO” and “ZEFA TARDO” // Acta Hort. 1992. No. 300. P. 287–292.

573. Theiler-Hedtrich K. Induction of dwarf F-12/1 cherry rootstocks by *in vitro* mutagenesis // Acta Hort. 1990. No. 280. P. 367–374.

574. Thomas T.D. Effect of sugars, gibberellic acid and abscisic acid on somatic embryogenesis in *Tylophora indica* (Burm.f.) Merrill // Chinese J. of Biotechnology. 2006. Vol. 22, No. 3. P. 465–471.

575. Tiel K., Enriquez G.A., Ceballo Y., Soto N., Fuentes A., Ferreira A., Coll Y., Pujol M. Development of a system for rapid plant regeneration from *in vitro* sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) meristematic tissue // Biotecnología Aplicada. 2006. Vol. 23, No. 1. P. 22–24.

576. Tilahun Rabuma *In vitro* propagation of geranium (*Pelargonium graveolens* L.) from nodal culture // Research and Reviews: Journal of Agricultural Science and Technology. 2015. Vol. 4, No. 2. P. 23–34.

577. Tirillini B., Tosi B. Presence of  $\alpha$ -pinen in plant callus cultures of *Smyrniun perfoliatum* L. // J. Essent. Oil Res. 1992. Vol. 4, No. 4. P. 431–432.

578. Tokumasu S., Kato M. Variation of chromosome numbers and essential oil components of plants derived from anther culture of the diploid and the tetraploid in *Pelargonium roseum* // Euphytica. 1979. Vol. 28, No. 2. P. 329–338.

579. Tour Jan, Khalida Khatoon *In vitro* regeneration of *Salvia santolinifolia* // Pak. J. Bot. 2014. Vol. 46, No. 1. P. 325–328.

580. Trejo-Tapia G., Arias-Castro C., Rodriguez-Mendiola M. Influence of the culture medium constituents and inoculum size on the accumulation of blue pigment and cell growth of *Lavandula spica* // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2003. Vol. 72, No. 1. P. 7–12.

581. Tripathi L., Tripathi J.N. Role of biotechnology in Medicinal Plants // Tropical J. Pharmaceutical Res. 2003. No. 2. P. 243–253.

582. Truskinov E.V., Frolova D.V., Antonova O.J. The meristem potato variability *in vitro* and *in vivo* culture // The Biology of Plant Cells *In Vitro* and Biotechnology: VIII Intern. conf., Saratov, 9-13 sept. 2003.:abstracts. Saratov, 2003. P. 324–325.

583. Tsay H.-S., Lee C.-Y., Agrawal D.C., Basker S. Influence of ventilation closure, gelling agent and explant type on shoot bud proliferation and hyperhydricity in *Scrophularia yoshimurae* – a medicinal plant // In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. 2006. Vol. 42, No. 5. P. 445–449.

584. Tsuru M., Koda M., Inoue M. Comparative effect of different types of cytokinin for shoot formation and plant regeneration in leaf-derived callus of lavender (*Lavandula vera* D.C.) // Sci. Hort. (Neth.). 1999. Vol. 81, No. 3. P. 331–336.

585. Tsuru M., Koda M., Inoue M. Efficient plant regeneration from multiple shoots formed in the leaf-derived callus of *Lavandula vera*, using the “open culture system” // Sci. Hort. 2000. Vol. 86, No. 1. P. 81–88.

586. Tsuru M., Inoue M., Kameoka H. Variation in essential oil components in regenerated lavender (*Lavandula vera* D.C.) plants // Sci. Hort. 2001. Vol. 88, No. 4. P. 309–317.

587. Turker A.U., Yucesan B., Gurel E. *In vitro* regeneration of *Achillea*

*millefolium* L. from shoot-tips and root segments of seedlings // J. Plant Biochem. Biotech. 2009. Vol. 18 (1). P. 01–05.

588. Ulubelen A. Pharmacological activities of Labiatae plants // Natural Product Chemistry at The Turn of the Century / Eds. Atta-ur-Rahman, M. Iqbal Choudhary, K.M. Khan. Karachi, Pakistan: Print Arts Publishers, 2002. P. 451–470.

589. Uma S., Lakshmi S., Saraswathi M.S., Akbar A., Mustaffa M.M. Embryo rescue and plant regeneration in banana (*Musa* spp.) // Plant Cell Tiss Organ Cult. 2011. Vol. 105. P.105–111.

590. Van Harten A.M. Mutation breeding: theory and practical applications. Cambridge University Press (UK), 1998. 353 p. [Electronic source]. URL: [http://books.google.com.ua/books?id=rXuj5R0pW\\_QC&printsec=frontcover&hl=ru#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.ua/books?id=rXuj5R0pW_QC&printsec=frontcover&hl=ru#v=onepage&q&f=false).

591. Vlizadeh M., Safarnejad A., Nematzadeh G.A., Kazemitabar S.K. Regeneration of plantlets from embryo explants of *Bunium persicum* (Boiss.) B. Fedtsch. // Indian J. Crop Science. 2006. Vol. 1, No. 1-2. P. 93–96.

592. Vojtech B., Kodytek K. Vorauslese der T-Mutanten von Chrysanthemen bei der kultur *in vitro* // Acta Pruhonic. 1988. Vol. 55, No. 1. P. 3–13.

593. Vujović T., Ružić Dj., Cerović R. *In vitro* shoot multiplication as influenced by repeated subculturing of shoots of contemporary fruit rootstocks // Hort. Sci. (Prague). 2012. Vol. 39. P.101–107.

594. Vysotskiy V.A. Appearance of forms not true to type during clonal micropropagation of horticultural plants // The Biology of Plant Cells *In Vitro* and Biotechnology: VIII Intern. conf., Saratov, 9-13 sept. 2003.:abstracts. Saratov, 2003. P. 356–357.

595. Wang Y., Kumar P.P. Heterologous expression of Arabidopsis ERS1 causes delayed senescence in coriander // Plant Cell Reports. 2004. Vol. 22, No. 9. P. 678–683.

596. Watanabe K., Yamada Y. Selection of variants with high level of biotin from cultured green *Lavandula vera* cells irradiated with gamma rays // Plant Cell Physiol. 1982. Vol. 23, No. 8. P. 1453–1456.

597. Watanabe K., Sato F., Furuta V., Yamada Y. Induction of pigment production by S –containing compounds in cultured *Lavandula vera* cells // Agric. Biol. Chem. 1985. Vol. 49, No. 2. P. 533–534.

598. Wawrosch C., Kopp B., Kubelka W. *In vitro* propagation of tetraploid *Achillea ceretanica* Sennen. // Pharmac. Pharm. Lett. 1997. Vol. 7. P. 116–118.

599. Wysokinska H., Chmiel A. Produkcja roslinnych metabolitów wtórnych w kulturach organów transformowanych // Biotechnologia. 2006. Vol. 4, No. 75. P. 124–135.

600. Xian Ri Li, Eun-Soo Seong, Il-Seop Kim, Chang-Yeon Yu Micropropagation and RAPD analysis of somaclonal variants in *Lavandula spica* cv. Marino // Korean Journal of medicinal crop science. 1999. Vol. 7, No. 2. P. 94–100.

601. Xiao-Ba Wu, Jing Wang, Ji-Hong Liu, Xiu-Xin Deng Involvement of polyamine biosynthesis in somatic embryogenesis of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis*) induced by glycerol // J. Plant Physiology. 2009. Vol. 166, No. 1. P. 52–62.

602. Xu X., Lu J., Ren Z., Wang H. Callus induction and somatic embryogenesis in muscadine and seedless bunch grapes (*Vitis*) from immature ovule culture // Proc. Fla. State Hort. Soc. 2005. No. 118. P. 260–262.

603. Yaacob I.S., Mahmad N., Taha R.M., Mohamed N. , Yussof A.I.M., Saleh A. Optimization of culture condition (sucrose, pH, and photoperiod) for *in vitro* regeneration and early detection of somaclonal variation in ginger lime (*Citrus assamensis*) // The Scientific Word Journal. 2014. Vol. 2014. Article III 262710. 9 p.
604. Yang X.M., Cao Z.Y., An L.Z., Wang Y.M., Fang X. *In vitro* tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.) // Euphytica. 2006. Vol. 152, No. 2. P. 217–224.
605. Yegorova N., Brailko V., Stavtzeva I., Mitrofanova I. Some morphophysiological features of lavender cultivar micropropagated *in vitro* by meristem culture // Agriculture & Forestry. 2018. Vol. 64, No. 1. P. 105–111.
606. Yegorova N., Stavtzeva I., Zolotilov V. Obtaining Essential Oil Rose Hybrids Using Biotechnological Methods // In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal. 2020. Vol. 56, 42-65. P. 2073.
607. Zagorskaya M., Yegorova N. Effect of prolonged cultivation on the micropropagation *in vitro* of mint cultivars and breeding samples // BIO Web of Conferences. 2018. Vol. 11. No. 00049.
608. Zahed Hossain, Mandal A.K.A., Datta S.K., Biswas A.K. Development of NaCl-tolerant line in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. through shoot organogenesis of selected callus line // J. of Biotechnology. 2007. Vol. 129, No. 4. P. 658–667.
609. Zee S.J. Studies on adventive embryo formation in the petiole explants of coriander (*Coriandrum sativum*) // Protoplasma. 1981. Vol. 107, No. 1-2. P. 21–26.
610. Ziarovska J., Bezo M., Hrdlickova M., Fernandez E. Standardization and reproducibility of random marker based analysis of micropropagated crimson beebalm // Genetika. 2014. Vol. 46, No. 3. P. 855–864.
611. Ziauddin A., Kasha K.J. Long-term callus cultures of diploid barley (*Hordeum vulgare*). II Effect of auxins on chromosomal status of cultures and regeneration of plants // Euphytica. 1990. Vol. 48, No. 3. P. 279–286.
612. Ziga Bolta, Dea Baricevic, Borut Bohanec, Samo Andresek A preliminary investigation of ursolic acid in cell suspension culture of *Salvia officinalis* // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2000. Vol. 62, No. 1. P. 57–63.
613. Zuzarte M.R., Dinis A.M., Cavaleiro C., Salgueiro L., Canhoto J.M. Trichomes, essential oils and *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae) // Industrial Crops and Products. 2010. No. 32. P. 580–587.

Научное издание

**Егорова Н. А.**

**БИОТЕХНОЛОГИЯ ЭФИРОМАСЛИЧНЫХ РАСТЕНИЙ:  
СОЗДАНИЕ НОВЫХ ФОРМ И МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ  
*IN VITRO***

*Монография*

Формат 70x100/16 Усл. печ. л. 26,0. Тираж 500 экз.

Издательство: Издательский Дом «Автограф»  
295018, Республика Крым, г. Симферополь,  
Линейная, 2, литера М, помещение 102  
+7 (978) 599-92-29; office@avtograf.press