

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ЦЕНТРАЛЬНЫЙ СИБИРСКИЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ЗАЙЦЕВА Юлианна Геннадьевна

**ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА И РАЗМНОЖЕНИЯ
IN VITRO НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ
РОДА *RHODODENDRON L.***

03.02.01 – “Ботаника”

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель –
доктор биологических наук
Новикова Т. И.

Новосибирск - 2015

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1. Таксономия рода <i>Rhododendron</i>	9
1.2. Эколого-биологические особенности исследуемых видов.....	11
1.3. Традиционные методы размножения представителей рода <i>Rhododendron</i>	15
1.4. Использование биотехнологических подходов для массового размножения ценных генотипов растений.....	18
1.5. Инициация процессов морфогенеза <i>in vitro</i> из листовых эксплантов	33
1.6. Особенности клонального микроразмножения рододендронов	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	48
2.1. Объекты исследования	48
2.2. Материалы и оборудование для исследования в культуре <i>in vitro</i>	50
2.3. Стерилизация эксплантов.....	51
2.4. Введение в культуру и микроразмножение исследуемых видов.....	51
2.5. Укоренение и адаптация регенерантов.....	56
2.6. Морфогистологический анализ процессов регенерации <i>in vitro</i>	58
2.7. Статистическая обработка результатов	59
ГЛАВА 3. МОРФОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ СЕМЯН НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА <i>RHODODENDRON</i>	60
3.1. Проращивание семян.....	61
3.2. Особенности регенерации побегов под действием различных регуляторов роста	63
3.3. Элонгация побегов на безгормональных средах	66
ГЛАВА 4. ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОБЕГОВ <i>DE NOVO</i> ИЗ ЛИСТОВЫХ ЭКСПЛАНТОВ	69
4.1. Влияние различных концентраций и способов обработки тидиазу- роном на регенерацию побегов <i>R. catawbiense</i> «Grandiflorum» и <i>R. sichotense</i>	70
4.2. Особенности элонгации и развития побегов на безгормональных средах	75
4.3. Гистологический анализ процессов морфогенеза в культуре листовых эксплантов	78

ГЛАВА 5. РЕГЕНЕРАЦИЯ ПОБЕГОВ <i>DE NOVO</i> ИЗ ФЛОРАЛЬНЫХ ЭКСПЛАНТОВ.....	83
5.1. Введение в культуру флоральных эксплантов <i>R. «Pohjola's daughter»</i>	84
5.2. Система регенерации побегов из флоральных эксплантов <i>R. dauricum</i>	86
5.3. Регенерация побегов из флоральных эксплантов <i>R. sichotense</i>	89
ГЛАВА 6. УКОРЕНЕНИЕ И АДАПТАЦИЯ РЕГЕНЕРАНТОВ К УСЛОВИЯМ <i>EX VITRO</i>	93
ВЫВОДЫ.....	101
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	103
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	124

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:

БАП – 6-бензиламинопурин;

ИУК – β-индолилуксусная кислота;

ИМК – индолил-3-масляная кислота;

2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксисукусная кислота;

НУК – 1-нафтилуксусная кислота;

ТДЗ – тидиазурон;

2-іР – 2-изопентиладенин;

Зеа – зеатин;

АМ – питательная среда Андерсона;

АМ0 – безгормональная среда Андерсона;

MS – питательная среда Мурасиге и Скуга;

WPM – питательная среда для древесных растений;

ЕМ – питательная среда Экономоу и Райда.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Представители рода Рододендрон (*Rhododendron* L.) семейства вересковых (*Ericaceae*) насчитывают около 1000 видов (Chamberlain et al., 1996) и множество сортов, гибридов и форм. Благодаря высочайшим декоративным свойствам, рододендроны широко используются в озеленении и ландшафтном дизайне в Европе и Северной Америке, однако, невысокая морозоустойчивость многих сортов ограничивает их культивирование в суровых климатических условиях Западной Сибири. Во флоре Сибири и Дальнего Востока встречаются 16 видов рододендронов, включая *Rhododendron dauricum* L., *R. sichotense* Pojark и *R. schlippenbachii* Maxim., которые отличаются не только высокой декоративностью, но и характеризуются морозоустойчивостью и способностью произрастать на слабокислых почвах. Кроме того, значительный интерес представляют вечнозеленые сорта, например, североамериканский гибрид *R. catawbiense* cv. Grandiflorum, как перспективный источник признаков устойчивости к низким температурам и высокой инсоляции. Указанные генотипы рододендронов могут быть не только рекомендованы для выращивания в сибирских условиях, но и служить исходным материалом для дальнейшей селекции и получения новых сортов на их основе.

Наиболее эффективным методом массового воспроизводства рододендронов в настоящее время является клональное микроразмножение (Briggs, 1988; Preece, Immel, 1991; Hsia, Korban, 1997; Pavingerova, 2009). Однако, для большинства дикорастущих видов Сибири и Дальнего Востока эти технологии не разработаны. Применение протоколов, используемых для микроразмножения вечнозеленых видов и сортов, может быть неэффективно из-за генотипических различий этих растений.

Морфогенез растений *in vitro* является ключевым процессом как для разработки эффективных протоколов клонального микроразмножения ценных генотипов, так и для познания фундаментальных основ биологии развития растений. Несмотря на значительное количество публикаций по микро-

размножению рододендронов (Eeckhaut et al., 2010), имеющиеся единичные данные гистологических исследований, не дают представления о процессах клеточной детерминации и морфологической дифференциации, связанных с побегообразованием *de novo*.

Цель и задачи исследования. Цель работы – выявить особенности органогенеза побегов *in vitro* морозоустойчивых видов и сортов рододендронов и разработать эффективные технологии их клонального микроразмножения.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

- создать системы регенерации побегов из проростков, листовых и флоральных эксплантов с использованием различных регуляторов роста;
- исследовать влияние тидиазурона на процессы инициации морфогенеза в культуре *in vitro*;
- установить тип и последовательность этапов морфогенеза из листовых эксплантов на основе морфогистологического анализа;
- разработать протоколы клонального микроразмножения морозоустойчивых видов и сортов рода *Rhododendron*, включающие эффективные приемы укоренения и адаптации регенерантов.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Инициация процессов регенерации побегов *de novo* в культуре листовых эксплантов *R. sichotense* и *R. catawbiense* «Grandiflorum» происходит в эпидермальном слое адаксиальной стороны основания листовой пластины, при этом видовые различия проявляются на дальнейших этапах морфогенеза: появлению почек у *R. sichotense* предшествует образование протуберанцев на поверхности листовых эксплантов, а органогенез у *R. catawbiense* «Grandiflorum» проходит через формирование эмбриоидоподобных структур.
2. Предкультивирование флоральных эксплантов *R. dauricum* и *R. sichotense* на безгормональных средах с последующим переносом на индукционные среды, содержащие регуляторы роста, позволяет ускорить получение морфогенного ответа и увеличить частоту регенерации.

Научная новизна работы. Впервые проведена оценка морфогенетического потенциала различных типов эксплантов в зависимости от действия регуляторов роста и генотипов рододендронов. Установлена эффективность использования синтетического регулятора роста – тидиазурона – путем импульсной обработки или при внесении в среды для стимуляции побегообразования в культуре *in vitro*. Впервые проведен гистологический анализ хронологической последовательности этапов морфогенеза при регенерации побегов из листовых эксплантов *R. sichotense* и *R. catawbiense* «Grandiflorum».

Практическая значимость. Разработаны протоколы клонального микроразмножения с использованием различных типов эксплантов (семена, листья, флоральные экспланты) высоко декоративных морозоустойчивых представителей рода Рододендрон: *R. dauricum*, *R. sichotense*, *R. schlippenbachii*, *R. catawbiense* «Grandiflorum» и *R.* «Pohjola's Daughter», включающие получение стерильных культур, оптимизацию и разработку состава индукционных сред для запуска процессов прямого органогенеза, укоренение и адаптацию регенерантов к условиям *ex vitro*. Использование импульсной обработки регуляторами роста, а также предкультивирования на безгормональных средах позволяет существенно сократить продолжительность некоторых этапов клонального микроразмножения. Оптимизирован процесс укоренения и адаптации регенерантов к условиям *ex vitro*. Созданная эффективная система регенерации из листовых эксплантов является основой для дальнейшего получения новых форм и сортов рододендронов с помощью агробактериальной трансформации.

Апробация работы. Основные результаты исследований были представлены на I Всероссийской научно-практической конференции «Ботаническое образование в России: прошлое, настоящее, будущее» (Новосибирск, 2013); Международной научно-практической конференции «Состояние и перспективы сибирского садоводства» (Барнаул, 2013); Всероссийской молодежной конференции участием иностранных ученых «Растительный мир Север-

ной Азии: проблемы изучения и сохранения биоразнообразия» (Новосибирск, 2013); X Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (Казань, 2013); Международной научной конференции по биологии и биотехнологии растений (Алматы, 2014); III(V) Всероссийской молодежной конференции с участием иностранных ученых «Перспективы развития и проблемы современной ботаники» (Новосибирск, 2014).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 работ, в том числе 2 – в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 6 глав, выводов, списка литературы и приложения. Библиографический список включает 214 источников, из них – 159 на иностранном языке. Работа изложена на 128 страницах, содержит 15 таблиц и 26 рисунков.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю д.б.н. Новиковой Татьяне Ивановне за оказанную помощь и руководство в процессе выполнения и написания диссертации. Выражаю признательность д.б.н., проф. Вере Алексеевне Черемушкиной за консультации и обсуждение результатов; с.н.с. Красникову Александру Анатольевичу за помощь и технические консультации при работе с микроскопическим оборудованием ЦКП ЦСБС СО РАН, а также благодарю всех сотрудников лаборатории биотехнологии за поддержку и ценные советы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Таксономия рода *Rhododendron*

Род *Rhododendron* – крупнейший в семействе Вересковых (*Ericaceae* Juss.), который включает в себя, по разным оценкам, от 800 до 1300 вечнозеленых, полувечнозеленых и листопадных видов и более 10 000 сортов (Кондратович, 1981; Chamberlain, 1982, 1996). На территории Российской Федерации произрастают 16 видов рододендронов, причем 13 из них встречаются, только в Сибири и на Дальнем востоке (Растительные ресурсы, 2009). В связи с большой изменчивостью видов, входящих в род *Rhododendron*, сложно установить филогенетические отношения внутри рода. До сих пор не существует единой общепризнанной классификации рода *Rhododendron*. Созданные ранее на основе морфологических и анатомических признаков классификации рода, в настоящее время уточняются, дополняются, а иногда и пересматриваются на основе современных биохимических и молекулярно-генетических данных.

Существуют две основные классификации рода *Rhododendron*. Отечественные авторы выделяют в роде *Rhododendron* 9 подродов, которые разделяются на ряды, так, изучаемые виды *R. dauricum* L., *R. sichotense* Pojark составляют ряд *Daurica* Pojark подрода *Rhodorastrum* (Maxim.) Drude. *R. schlippenbachii* относят к подроду азалиевых *Nomazalea*, *R. catawbiense* – к подроду вечнозеленых *Hymenanthes* (Пояркова, 1952).

Альтернативная система рода *Rhododendron*, основанная на анатомо-морфологических признаках, принята в западных странах и Китае (Chamberlain, 1996). Согласно этой классификации *R. dauricum* и *R. sichotense* относят к подроду *Rhodorastra* секции *Rhododendron*, *R. schlippenbachii* входит секцию *Sciadorodian* подрода *Pentanthera*, а *R. catawbiense* – в секцию *Pontica* подрода *Hymenanthes*. Основываясь на данных, полученных в результате секвенирования ядерной ДНК различных видов рододендронов, американские исследова-

тели внесли изменения в классификацию Д. Чемберлена (рис. 1). Авторы не выделяют подрод *Pentanthera*, как самостоятельный, а секцию *Sciadorodian* включают в подрод *Azaleastrum*, что согласуется с данными М.А. Александровой (1975), Е.А. Карповой и А.В. Каракулова (Карпова, Каракулов, 2013).

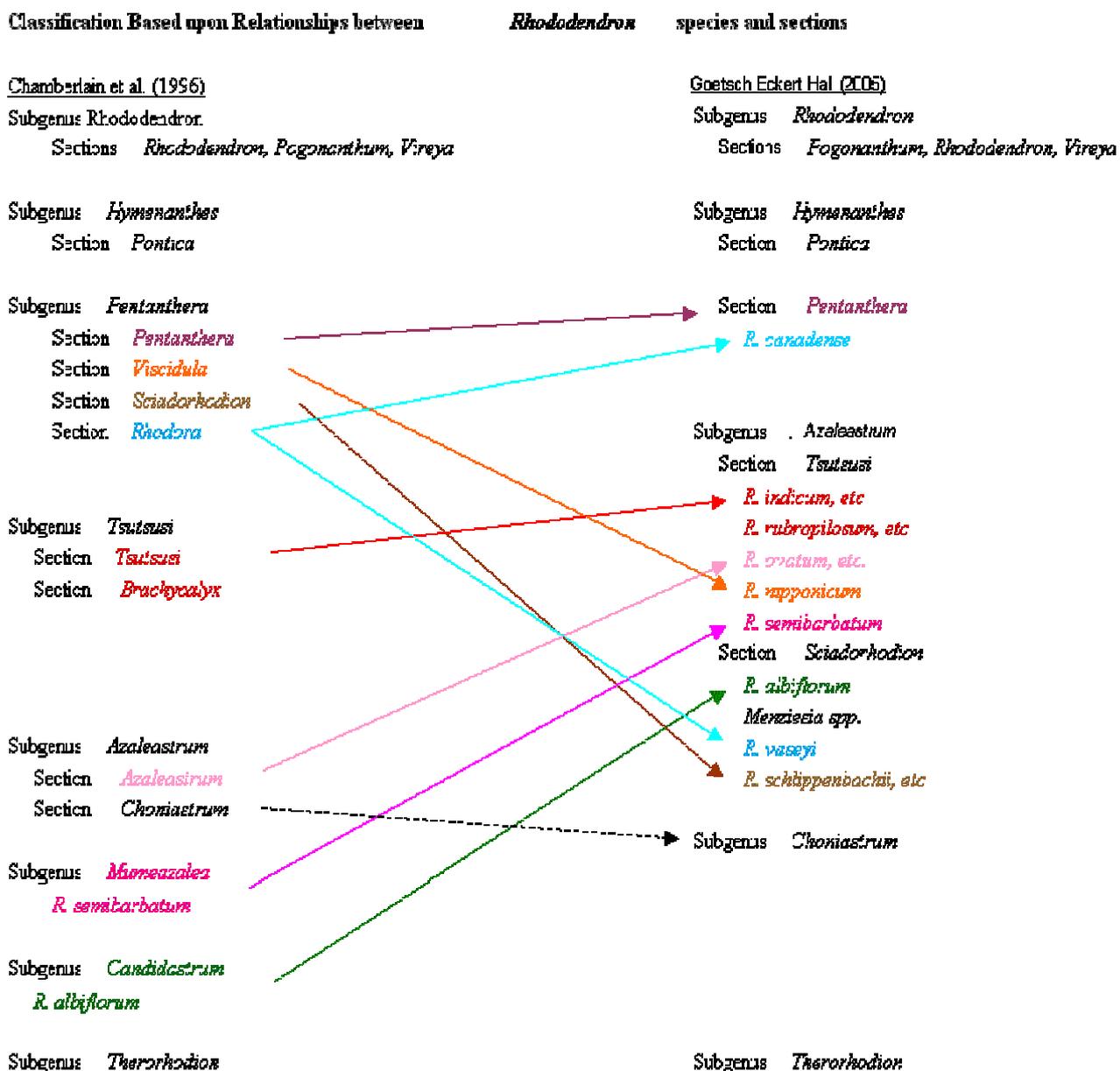


Рис. 1. Таксономия рода *Rhododendron* (Goetsch et al., 2005)

Систематическое положение *R. sichotense* долгое время определяли на уровне подвида *R. dauricum* (Ворошилов, 1982), одновременно с этим существовало мнение о самостоятельности этих видов (Пояркова, 1952; Александрова,

ва, 1975, 1976). В изданиях «Сосудистые растения советского Дальнего Востока» (Хохряков, Мазуренко, 1991) и «Флора Сихотэ-Алинского биосферного заповедника» (Галанин и др., 2004) *R. sichotense* описан как подвид *R. mucronulatum*, в то время как некоторые авторы считают все три дальневосточных вида самостоятельными (Вологодина, 2007; Усенко, 2010, Тихонова, 2013). Современные исследования состава и содержания фенольных соединений, а также генома *R. dauricum* и *R. sichotense* указывают на недавнее обособление этих видов, но для выявления четкой обособленности необходимо проведение популяционно-генетических исследований на основе методов, позволяющих провести скрининг всего генома (ISSR, RAPD или AFLP) (Куцев, Каракулов, 2010).

1.2. Эколого-биологические особенности исследуемых видов

Естественные ареалы представителей рода рододендрон располагаются в основном в холодных и умеренных областях северного полушария (рис. 2). Родиной большинства известных ныне видов является Восточная Азия. Их ареал включает бассейны больших рек, берущих начало в горах Тибета, западные провинции Китая Сычуань и Юньнань, Корею и Японию, полуостров Камчатка, Новую Гвинею и северную Австралию. В Европе обнаружено лишь 9 дикорастущих видов, в Северной Америке – 29 видов (в основном, на побережье Тихого и Атлантического океанов). В Южной Америке и Африке в естественных условиях рододендроны не встречаются.

Из изучаемых нами видов дикорастущие полувечнозеленые (*R. dauricum*, *R. sichotense*) и листопадные (*R. schlippenbachii*) распространены в Азиатской части России, естественный ареал вечнозеленого *R. catawbiense* находится в Северной Америке.

R. sichotense произрастает на каменистых склонах и гребнях, на скалах и крупнокаменистых россыпях восточных склонов Сихотэ-Алиня. Образует подлесок в горных лиственничных и темнохвойных лесах. Обильно цветет

только на открытых местах. Предпочитает слабокислые или нейтральные почвы.

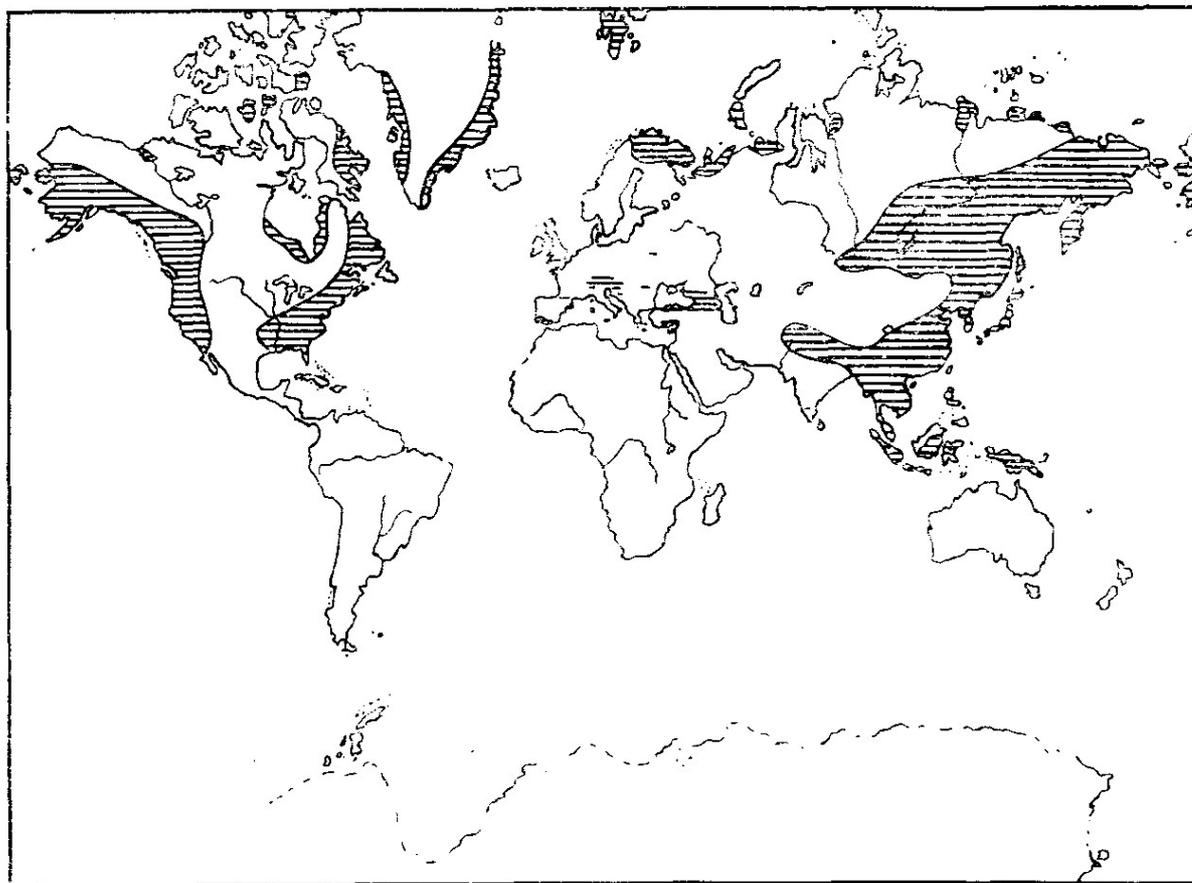


Рис. 2. Области распространения дикорастущих видов рододендронов (Berg, 1969)

При изучении полиморфизма по окраске венчика некоторые авторы выделяют несколько разновидностей и форм у *R. sichotense*:

- 1) *R. sichotense* var. *roseiflora* Vrisch – рододендрон сихотинский розовоцветковый;
- 2) *R. sichotense* var. *roseo-ochroleuflora* Vrisch – рододендрон сихотинский кремовоцветковый.

Выделены две сезонные формы у рододендрона сихотинского:

- 1) *R. sichotense* f. *praecox* Vrisch – раннецветущая;
- 2) *R. sichotense* f. *serotinus* Vrisch – позднецветущая.

Разница в сроках цветения этих форм составляет 10–20 дней. Существуют и переходные формы по срокам цветения. Представляют определенный интерес с точки зрения декоративности экземпляры, встречающиеся преимуще-

ственно в высокогорьях, у которых мелкие светло-пурпурные цветки до 1,5 см в диаметре и, как корреляционный признак, листья почти округлой формы. Рододендрон сихотинский форма мелкоцветковая – *R. sichotense* f. *parviflorus* Vrisch – рекомендован для введения в культуру, учитывая его неприхотливость и зимостойкость (Врищ, 2010 а, б).

Таким образом, *R. sichotense* дальневосточный морозостойкий полувечнозеленый кустарник до 1,5 м высотой является ценным декоративным растением и может служить материалом для получения новых высокодекоративных и морозостойких сортов.

Одним из перспективных природных видов является *R. dauricum* – зимостойкий кустарник высотой 0,5–2,0 м. В естественных условиях произрастает в степных и горных районах юга Западной Сибири (Алтай, Тува), в Восточной Сибири (Саяны, Забайкалье), на российском Дальнем Востоке, Монголии и Китае (Коропачинский, Встовская, 2002). Встречается как одиночно, так и зарослями под пологом хвойных и лиственных лесов. Предпочитают щебнистую слабокислую почву. Цветет в природных условиях с мая по июнь. *R. dauricum* относится к светолюбивым растениям, переносит легкую полутень (Петухова, 2006).

R. schlippenbachii – редкий дальневосточный вид, произрастающий в Хасанском районе Приморского края, на территории Кореи и Китая, обладает высокими декоративными качествами и является ценным ресурсным растением. Рододендрон Шлиппенбаха – листопадный раскидистый кустарник около 2 м высотой.

Выделяют три экобиоморфы *R. schlippenbachii*:

- 1) аэроксильный малоствольный высокий кустарник или дерево, обычен под пологом дуба или среди сосны погребальной;
- 2) геоксильный многоствольный кустарник опушек;
- 3) угнетенный малорослый кустарник с утолщенным деревянистым «наплывом» в зоне кущения, характерный для открытых склонов и вершин

гор («наплыв» – реакция растений на частые пожары, чаще всего низовые) (Мазуренко, 1980; Врищ, 2009).

Рододендрон Шлиппенбаха является полиморфным видом с варьирующей окраской венчика. В природных условиях у *R. schlippenbachii* существуют несколько форм по срокам цветения, которые можно объединить в группы: ранне-, средне- и поздноцветущие. Разница в сроках цветения между первой и последней группами составляет 25–30 дней (Петухова, 2006; Врищ, 2011).

В соответствии с квалификацией категорий редкости, принятых в Красной книге Международного союза охраны природы (МСОП) (SUCN Plant Red Data book, 1978) и Списке редких и исчезающих растений Европы (List of rare threatened and endemic plants in Europe, 1977), *R. schlippenbachii* относится к уязвимым видам. Промышленная заготовка, срезка побегов для выгонки и лесные пожары в местах естественного произрастания приводят к снижению численности популяций и ставят под угрозу существование этого вида. Вид занесен в Красную книгу РФ, а также в региональные сводки редких растений (Харкевич, Качура, 1981; Красная книга СССР, 1984; Красная книга РСФСР, 1988; Красная книга Приморского края, 2008; Красная книга РФ, 2008). В сводке «Растения Красной книги России в коллекциях ботанических садов и дендрариев» (Алексеева и др., 2005) *R. schlippenbachii* присвоена категория редкости 2 (V).

R. schlippenbachii достаточно морозостойкий вид, однако нуждается в продолжительном вегетационном периоде (180–200 дней) (Врищ, 2011). Продолжительность жизни – более 50 лет. Предпочитает слабокислую, хорошо дренированную или сухую щебнистую почву.

В естественных условиях *R. catawbiense* встречается в восточной части Северной Америки: в верхнем поясе Аллеганских гор на высоте около 2000 м над уровнем моря, в истоках р. Кэтевби (Кондратович, 1981). Растет под пологом леса, иногда образует чистые заросли. Предпочитает богатые, хорошо дренированные участки, со слабокислой реакцией почвы. Продолжительность

жизни превышает 100 лет. *R. catawbiense* – один из наиболее зимостойких вечнозеленых рододендронов (Александрова, 2007). Подходит для селекции по признакам зимостойкости и крупноцветковости.

1.3. Традиционные методы размножения представителей рода *Rhododendron*

Виды рода *Rhododendron* в естественных условиях размножаются как вегетативно, так и с помощью семян.

Семена рододендронов мелкие, разносятся ветром на значительные расстояния от маточного куста. Попадая в рыхлую и влажную почву, семена прорастают и дают большое количество сеянцев, которые со временем образуют обширные, труднопроходимые заросли рододендронов. Кроме того, в природе рододендроны размножаются и отводками. С течением времени ветки рододендронов под давлением толстого слоя снега пригибаются к земле, постепенно покрываются опавшими листьями, мелкими ветками и другими органическими остатками растений и, таким образом, укореняются (Кондратович, 1981; Семенюк, 1988).

В садоводческой практике для размножения рододендронов применяют как генеративный, так и вегетативный методы. Семенами размножают в основном виды рододендронов, а для размножения сортового материала применяют только вегетативный метод: черенкование, прививку, размножение отводками и деление куста.

Семенное размножение

Дикорастущие рододендроны традиционно размножают семенами. Семена высеивают на подготовленный субстрат (торф : песок) зимой в теплице. Посев в открытый грунт зачастую не дает положительных результатов в условиях интродукции (Петухова, 2006). Для прорастания семян рододендронов необходим свет, температура воздуха 18–22°C и высокая влажность.

Ящики с семенами накрывают плёнкой или стеклом. Прорастание начинается на 10–25-й день в зависимости от видовых особенностей растения, всхожесть семян рододендронов обычно высокая до 90% у разных видов. После массового прорастания снимают пленку с ящиков и понижают температуру в теплице до 10°C. При этом очень важно соблюдать водный режим и не допускать загнивания корневой системы вследствие избыточного переувлажнения почвы (Кондратович, 1981).

Пикировку сеянцев проводят после появления первых настоящих листьев. На протяжении всего периода роста растения нуждаются в полной минеральной подкормке.

В открытый грунт молодые растения высаживают через 18–20 месяцев после посева. Следует отметить, что при выращивании в условиях культуры рододендроны переходят к цветению раньше, чем в естественных условиях произрастания. Так, если *R. schlippenbachii* в природе зацветает на 10-й год, то в условиях интродукции – на 5–6-й год с момента посева, *R. sichotense* – на 3-й год, *R. catawbiense* – 7-й год (Врищ, 2011).

При семенном размножении необходимо постоянно пополнять запас семян и соблюдать условия хранения: темнота, низкая температура и влажность. С каждым годом хранения всхожесть семян рододендронов значительно падает (Зарубенко, 1984; Сидоренко, 1995).

Несмотря на то, что разработаны технологии массового воспроизводства рододендронов из семян, этот способ имеет ряд ограничений в условиях Сибири. К недостаткам этого метода можно отнести технические трудности связанные с затратами на контроль микроклимата в теплице в зимний период, когда в условиях редких колебаний температур наиболее вероятен высокий выпад растений, дефицит семян для посева и длительный период получения коммерчески привлекательного посадочного материала.

Вегетативное размножение

Вегетативные методы размножения (прививки, черенкование, отводки,

деление куста) чаще применяют для размножения сортов, гибридов и разновидностей рододендронов.

Рододендроны относятся к трудно укореняемым растениям, поэтому черенкование, как метод размножения, используют не для всех видов и сортов представителей рода. Для трудно укореняемых сортов рододендронов применяют размножение прививкой. Через несколько лет корневая система подвоя заменяется на вновь образованную корневую систему привоя – образуется корнесобственное растение. Однако такой метод размножения требует наличие достаточного количества маточных растений для подвоя.

Деление куста считается любительским и используется при пересадке растений на новое место. Зачастую деление куста приводит к истощению растения и потере его декоративности. Размножение отводками применяется для получения ограниченного числа растений. Для получения сортового посадочного материала в большом количестве, необходимо иметь много маточных растений, причем эти растения должны быть достаточно крупными, с ветвями, низко расположенными у земли (Петухова, 2006).

Следовательно, вегетативное размножение не может служить основой для массового производства качественного посадочного материала рододендронов. Биотехнологические методы размножения древесных растений, основанные на культуре клеток, тканей и органов *in vitro*, позволяют преодолеть трудности традиционных способов размножения рододендронов связанные с массовым получением качественного посадочного материала, а так же решить проблему сохранения редких видов рододендронов.

Культивирование растительного материала в контролируемых условиях *in vitro*, имеет ряд преимуществ перед традиционными способами размножения:

- получение генетически однородного посадочного материала;
- освобождение растений от различного рода контаминации;
- высокий коэффициент размножения;
- преодоление проблем связанных с укоренением растений;

- широкие возможности для селекционного процесса;
- ускорение темпов онтогенеза у растений микроклонального происхождения;
- создание «банка» ценных генотипов;
- возможность проведения работ в течение года и экономия площадей, необходимых для выращивания посадочного материала.

Таким образом, используя небольшое количество исходного материала можно получить высококачественный посадочный материал в неограниченных количествах независимо от времени года. Кроме того, клональное микроразмножение – универсальный метод размножения и сохранения, как сортов, так и редких видов рододендронов, поскольку на выходе, полученные микроклоны, генетически идентичные материнскому растению. В то же время, если поставить задачу получения новых декоративных форм путем индукции соматической изменчивости, то можно получить генотипы, несущие признаки, повышающие коммерческую ценность исходных дикорастущих видов рододендронов.

1.4. Использование биотехнологических подходов для массового размножения ценных генотипов растений

Теоретические основы морфогенеза in vitro

Методы клонального микроразмножения широко используются для сохранения, размножения и генной трансформации растений. Широкие возможности этого метода основаны на уникальном свойстве растительных клеток: способности под воздействием экзогенных факторов давать начало новому растению. Такое свойство обусловлено тотипотентностью растительных клеток.

Тотипотентность растительных клеток дает гибкость при реализации онтогенетической программы, поэтому соматические растительные клетки способны изменять свой статус в условиях *in vitro*. Под влиянием экзогенных

факторов такие клетки реализуют разные онтогенетические программы: органогенез, каллусогенез или соматический эмбриогенез (Feher et al., 2003).

В последнее время клетки растений, способные к морфогенетическим изменениям, называют стволовыми клетками по аналогии с клетками животных (Weigel, 2002; Laux, 2003; Sablowski, 2004; Williams, 2005; Singh et al., 2010). Так, наряду с понятием тотипотентности вводится понятия о плюри- и мультипотентности стволовых клеток (Verdeil et al., 2007). Согласно этой концепции в результате деления мультипотентных клеток формируются клетки одного или нескольких типов. Плюрипотентные клетки находятся в апикальных меристемах побега и корня, их меристематическая активность ограничивается способностью давать начало только клеткам тканей корня или побега, причем авторы считают, что плюрипотентные клетки не способны образовывать соматические эмбриониды. Соматические клетки, изолированные из интактного растения, под воздействием индукционных сигналов становятся тотипотентными и приобретают способность формировать эмбриогенный каллус или непосредственно соматические эмбриониды. Таким образом, тотипотентные клетки – это единичные клетки, реализующие путь соматического эмбриогенеза, а плюрипотентные – путь органогенеза. (Verdeil et al., 2007; Gueye et al., 2009).

В последние годы при изучении процессов морфогенеза *in vitro* и разработке протоколов микроразмножения на его основе широкое распространение получила концепция М.Л. Христиансона и Д.А. Ворника (Christianson, Warnik, 1983, 1984, 1985). Согласно этой концепции в процессе морфогенеза выделяют 3 стадии:

- 1) дедифференциация и приобретение компетенции клеток экспланта;
- 2) индукция, определение судьбы клеток после воздействия экзогенными регуляторами роста;
- 3) дифференциация, собственно морфогенез.

Понимание последовательности событий, происходящих при регенерации растений *de novo*, дает возможность влиять на инициацию определенного

пути морфогенеза компетентных клеток (Burrit, Leung, 1995; Lo et al., 1997 a, b; Yancheva et al., 2003; Полубоярова и др., 2011). Изменение физиологического состояния, дедифференциация и последующее приобретение морфогенной компетентности происходят под влиянием стресса при изоляции экспланта или высоких доз ауксинов в относительно короткий период от 5 до 14 дней (Mertens et al., 1996, Mithila et al., 2003; Yancheva et al., 2003).

Выделяют две фазы морфогенеза – дедифференциацию и редифференциацию (рис. 3).

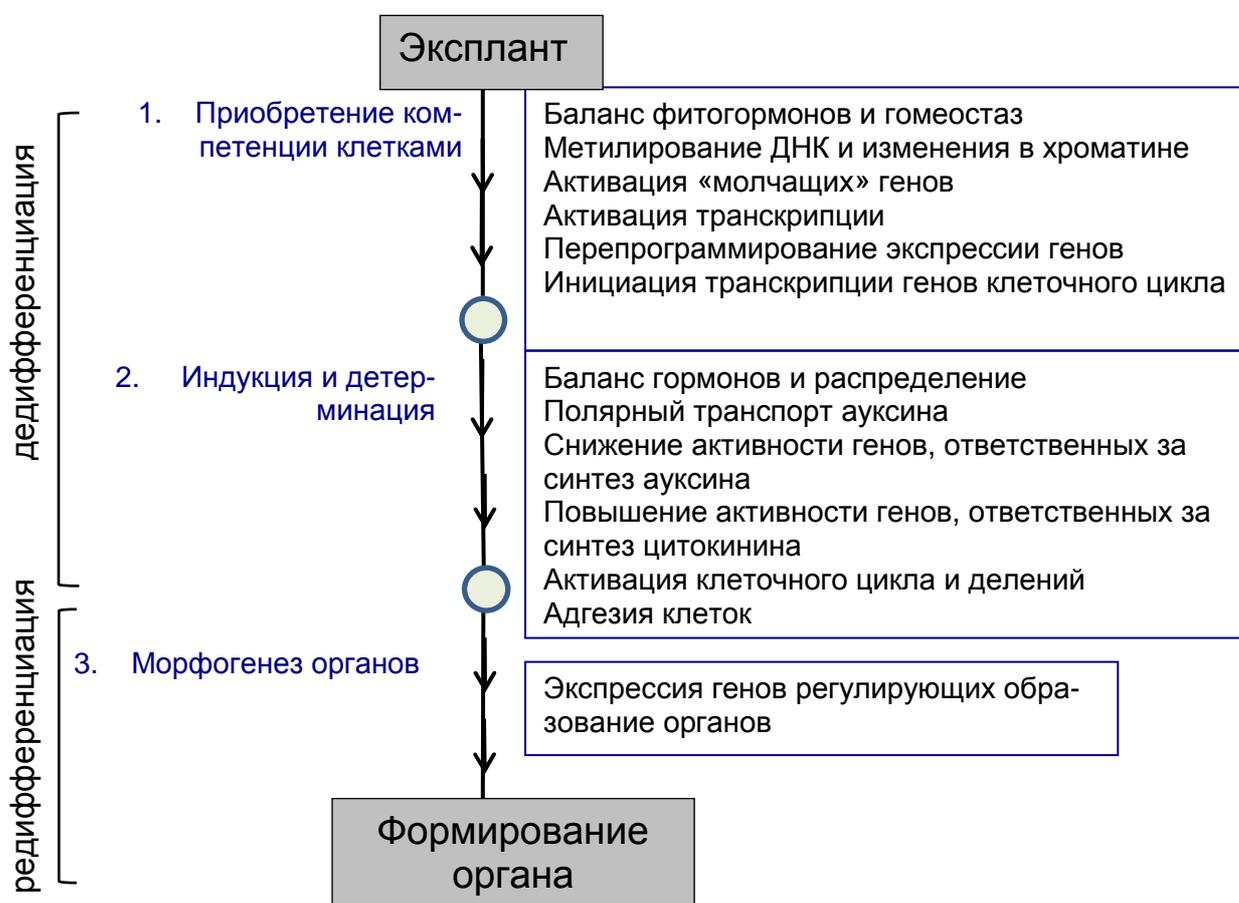


Рис. 3. Схема последовательности этапов морфогенеза адвентивных органов (Geneve, 2011 с изменениями)

Под действием экзогенных регуляторов роста наступает дедифференциация и приобретение клетками компетенции, то есть способность отвечать на индукционные гормональные сигналы, определяющие путь морфогенеза. При этом особую роль отводят ауксинам, поскольку тип и концентрация

ауксина определяет судьбу компетентных клеток на ранних стадиях. Клетки, реализующие тот или иной путь морфогенеза, полностью детерминированы и, далее, образование структур *de novo* может продолжаться независимо от экзогенных регуляторов роста (Yancheva et al., 2003; Trigiano, Gray, 2005).

Поскольку тотипотентностью обладает большинство растительных клеток, то использование эксплантов, лишенных меристем подобных апикальным, открывает широкие возможности для индукции целого спектра морфогенных реакций. С помощью такого подхода можно быстро получить генетически разнородный материал для дальнейшей генной трансформации или в достаточном количестве воспроизводить растения с исходными признаками. Также, инициируя соматический эмбриогенез, можно получать искусственные семена (Новикова, 2008, 2011; Ozden-Tokatly, 2008).

Регенерация растений может проходить различными путями. Н.В. Катаевой и Р.Г. Бутенко (1983) разработана классификация, в которой обозначены принципиальные различия морфогенных путей. Авторы выделяют два типа микроразмножения:

- 1) активация уже существующих меристем экспланта (апекс стебля, пазушные и спящие почки стебля);
- 2) инициация регенерации побегов или эмбриоидов *de novo*.

В последнем случае регенерация может достигаться либо прямым путем за счет образования адвентивных побегов или соматических эмбриоидов непосредственно тканями экспланта, либо непрямым путем, через формирование каллусной ткани с последующей дифференциацией эмбриоидов или адвентивных почек (Nicks, 1980). Схема возможных морфогенных путей развития клеток в культуре *in vitro* представлена на рис. 4.

Для микроразмножения древесных растений чаще используют регенерационный потенциал изолированных органов, инициируя с помощью экзогенных регуляторов роста прямой или непрямой морфогенез (Debergh, 1988;

Ahuja, 1988, 1991; Bajaj, 1989; Bonga, 1991).

Регенерация через каллусные культуры способствует появлению, соматической изменчивости. Возникновение соматических изменений может быть вызвано проявлением генетических (хромосомные нарушения, изменения ploидности) и эпигенетических (связанных с изменением экспрессии генов) изменений. Проявление соматической изменчивости может быть как недостатком, если требуется сохранить ценные генотипы, так и преимуществом, поскольку в этом случае происходит увеличение генетического разнообразия. Сохранение исходных признаков (генетическая стабильность) полученных микроклонов – одна из основных задач биотехнологии. В связи с этим при клональном микроразмножении редких видов и ценных генотипов растений необходимо уменьшить вероятность появления генетической изменчивости, минуя стадию каллусообразования, и стимулировать прямой морфогенез непосредственно из тканей экспланта.

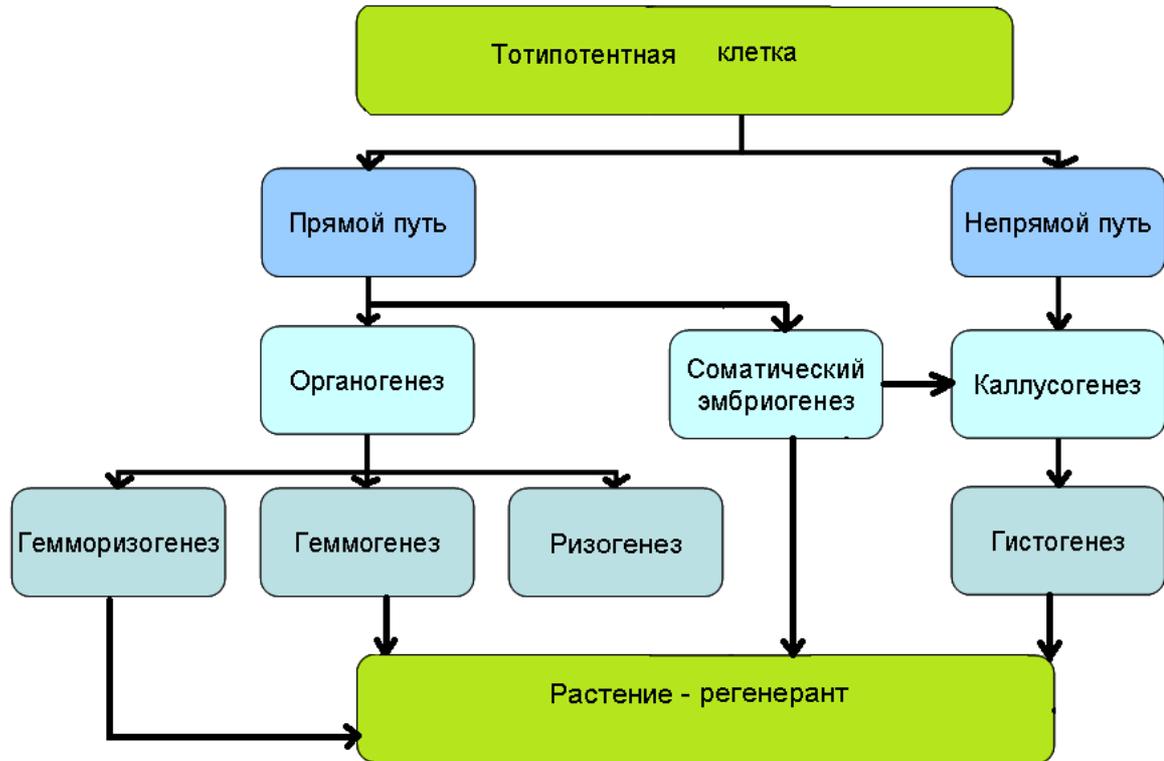


Рис. 4. Морфогенетические пути развития клеток *in vitro* (Батыгина, 1999 с изменениями)

Клональное микроразмножение растений

Клональное микроразмножение включает в себя четыре этапа (Miller, Murashige, 1976; George, 2008) (рис. 5):

- 1) стерилизация исходного материала и введение в культуру;
- 2) массовое размножение *in vitro*;
- 3) укоренение микроклонов;
- 4) адаптация, полученных регенерантов к условиям *ex vitro*.

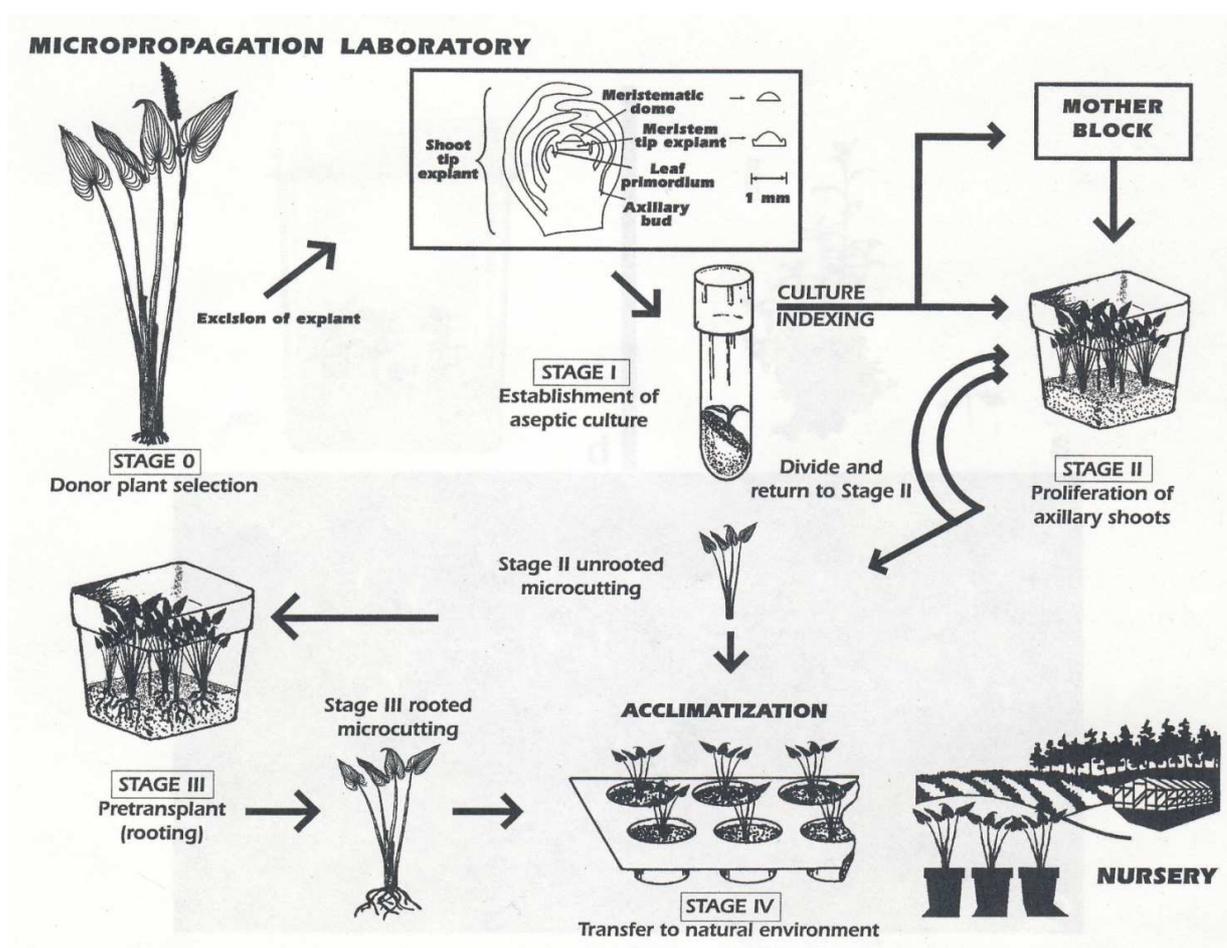


Рис. 5. Стадии клонального микроразмножения растений с использованием уже существующих меристем (Trigiano, Gray, 2000)

Для успешного введения в культуру экспланты подвергают поверхностной стерилизации. Чаще всего в качестве стерилизующих агентов используют соединения хлора, серебра и ртути, поскольку они эффективно освобо-

ждают поверхность исходного материала от бактериальной и грибной контаминации. Асептические экспланты помещают на питательные среды для индукции процессов регенерации.

Успешное введение в культуру зависит от сроков изоляции, возраста, размера и типа эксплантов, а также интенсивности окисления полифенолов при инокуляции на питательные среды. Повреждение при ранении тканей первичных эксплантов способствует выбросу полифенолов и стимулирует активность полифенолоксидазы. В результате фенольного окисления образуются токсические вещества – хиноны. Питательная среда и ткани экспланта чернеют, в конечном счете, это может стать причиной гибели эксплантов. Решить проблему фенольного окисления позволяет предварительное культивирование эксплантов в жидких средах с добавлением антиоксидантов, таких как аскорбиновая кислота, диэтилдитиокарбамат или поливинилпирролидон, а также снижение интенсивности освещения или культивирование в темноте (Кутас, 2009). Поэтому необходимо учитывать сезонную динамику накопления фенольных соединений для определения сроков изоляции эксплантов.

На этапе массового размножения растений необходимо использование различных экзогенных регуляторов роста. При определении оптимальных комбинаций и концентраций экзогенных цитокининов и ауксинов необходимо учитывать уровень биосинтеза регуляторов роста в тканях самого экспланта. Поскольку эндогенные ауксины и цитокинины синтезируются, соответственно, в тканях листовых примордиев и верхушки корня, то воздействие экзогенными регуляторами роста зависит типа используемых эксплантов. Так, для стимуляции побегообразования у эксплантов, не содержащих меристем, необходимы и ауксины, и цитокинины, в то время как пролиферация верхушек микропобегов может происходить без присутствия экзогенных ауксинов в среде (Murashige et al., 1972).

Реализация того или иного пути морфогенеза в системах *in vitro* определяется соотношением концентраций экзогенных регуляторов роста в питательной среде. Так, например, известно, что преобладание цитокининов в

среде для регенерации способствует прямой регенерации побегов, а ауксинов – образованию корней или каллуса (Skoog, Miller, 1957). Добавляя цитокинины в питательные среды, пролиферация побегов достигается либо за счет снятия апикального доминирования и развития пазушных почек, либо посредством дедифференциации клеток экспланта и формирования адвентивных побегов. Воздействие цитокининами лежит в основе клонального микроразмножения растений, поскольку они определяют уровень размножения, высоту побегов, а также частоту возникновения генетических вариаций (Kane, 2005). Кроме того, успешность и эффективность прохождения стадии собственно микроразмножения зависит от особенностей генотипа исходного растения, минерального состава питательных сред, а также от воздействия физических факторов при культивировании (свет, температура, влажность).

Микроклоны, полученные на стадии собственно микроразмножения, укореняют различными способами. В основе этих методов лежит обработка ауксинами, причем тип и концентрация ауксина для каждого вида определяется экспериментально.

Ризогенез чаще всего стимулируют в условиях *in vitro*. Регенеранты укореняют либо непосредственно на питательной среде, содержащей ИМК, либо при культивировании на безгормональной среде (Briggs, 1988, 1994), после предшествующего короткого замачивания их в водном растворе ИМК (Васильева, 2009; Almeida, 2005). Длительное воздействие ауксинами зачастую вызывает пролиферацию каллуса на базальном конце побега, из клеток которого впоследствии дифференцируются корни. Проводящая система таких корней не связана с проводящей системой побега, что приводит к гибели растений при дальнейшей адаптации. При коротких обработках регенерантов в растворе ауксинов, исключается образование каллуса, но корневая система, сформированная в условиях *in vitro* не функциональна, поскольку не имеет корневых волосков. Эта особенность может стать причиной гибели растений при переносе в условия *ex vitro* в субстрат для адаптации (Hazarika, 2006). Импульсная обработка ауксинами с последующим укоренением *ex vitro* непо-

средственно в почвенном субстрате или смеси торфа и песка, решает проблемы, связанные с укоренением *in vitro* и повышает выход качественного посадочного материала (Debergh, 1981, 1983).

Адаптация микроклонов к условиям *ex vitro* является наиболее ответственным этапом микроразмножения, поскольку именно на этой стадии высока вероятность потери большого количества регенерантов (Conner, 1982). Развитие микроклонов в культуре *in vitro* способствует появлению ряда морфологических, анатомических и физиологических аномалий, которые затрудняют перевод растения в условия *ex vitro*. Растениям, выращенным в условиях *in vitro*, присущи гетеротрофный тип питания, низкая фотосинтетическая активность, ограниченная способность регулировать транспирацию, редукция кутикулярного воска, слабая дифференцировка мезофилла и недостаточное развитие проводящей системы (Preece et al., 1991; Pospisilova, 1999; Nazarika, 2006).

Таким образом, перенос регенерантов в условия *ex vitro* связан с серьезными перестройками в морфо-анатомическом строении и физиологических процессах. Для успешной адаптации *ex vitro* и преодоления указанных выше ограничений растения переносят в грунт, сохраняя температурный режим, влажность и освещение на прежнем уровне. Затем постепенно снижают влажность и одновременно повышают интенсивность освещения. В некоторых случаях обогащают атмосферу, в которой адаптируются растения, углекислым газом, что способствует повышению адаптивной способности микроклонов за счет закрытия устьиц и снижения испарения воды растениями (Matysiak, 2001).

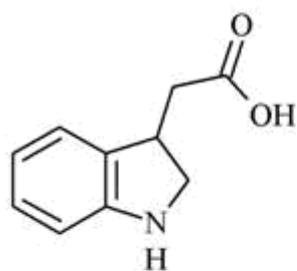
Регуляторы роста, используемые в культуре тканей растений

Наиболее часто используемые при микроразмножении древесных растений ауксины представлены на рис. 6. В культуре ткани используют ауксины природного и синтетического происхождения. Ауксин природного происхождения индолил-3-уксусная кислота (ИУК) малоактивен из-за быстрого окис-

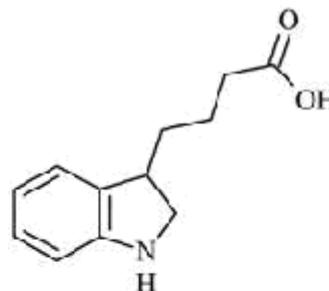
ления ИУК-оксидазой и нестабильности этого соединения на свету (фотоокисление). Более сильным эффектом обладают синтетические соединения, оказывающие ауксиновый эффект. Выделяют три группы синтетических аналогов ИУК:

1) производные индола, например индолил-3-масляная кислота (ИМК), которая более устойчива в тканях растения;

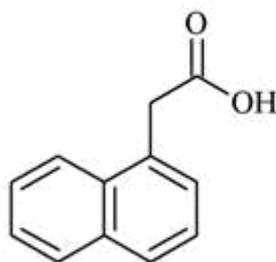
2) хлорзамещенные феноксипроизводные: 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота (1,4,5-Т) и др. устойчивые к разрушению и связыванию в тканях растений, и поэтому так высока их активность;



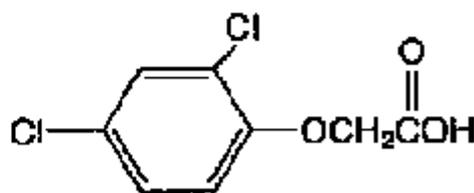
Indole-3-acetic acid (IAA)



Indole-3-butyric acid (IBA)



1-Naphthaleneacetic acid (NAA)



(2,4-dichlorophenoxy)acetic acid
2,4-D

Рис. 6. Ауксины, наиболее часто используемые в культуре ткани: индолил-3-уксусная кислота (ИУК); индолил-3-масляная кислота (ИВА); α -нафтилуксусная кислота (NAA); 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-D)

3) производные нафтилалкилкарбоновых кислот, такие как 1-нафтилуксусная кислота (1-НУК).

Повышенное содержание эндогенных ауксинов отмечено в меристематических тканях растений: апексах побегов, листовых примордиях, почках, завязях, развивающихся семенах, а также и в пыльце. Физиологическими эффектами ауксинов считают апикальное доминирование, коррелятивный рост, влияние на рост клеток в фазе растяжения, деление клеток, корнеобразование, дифференциацию ксилемы и др. Действие ауксинов находится в зависимости от концентрации. Повышение концентрации ауксина выше оптимальной тормозит рост растений. Влияние ауксинов на рост растений связано с усилением притока воды и питательных веществ под действием этих регуляторов роста. Ауксины используют для стимуляции пролиферации каллуса и ризогенеза.

Наиболее часто используемыми цитокининами являются 6-бензил-аденин, кинетин, зеатин и 2-изопентиладенин (2-iP) (рис. 7).

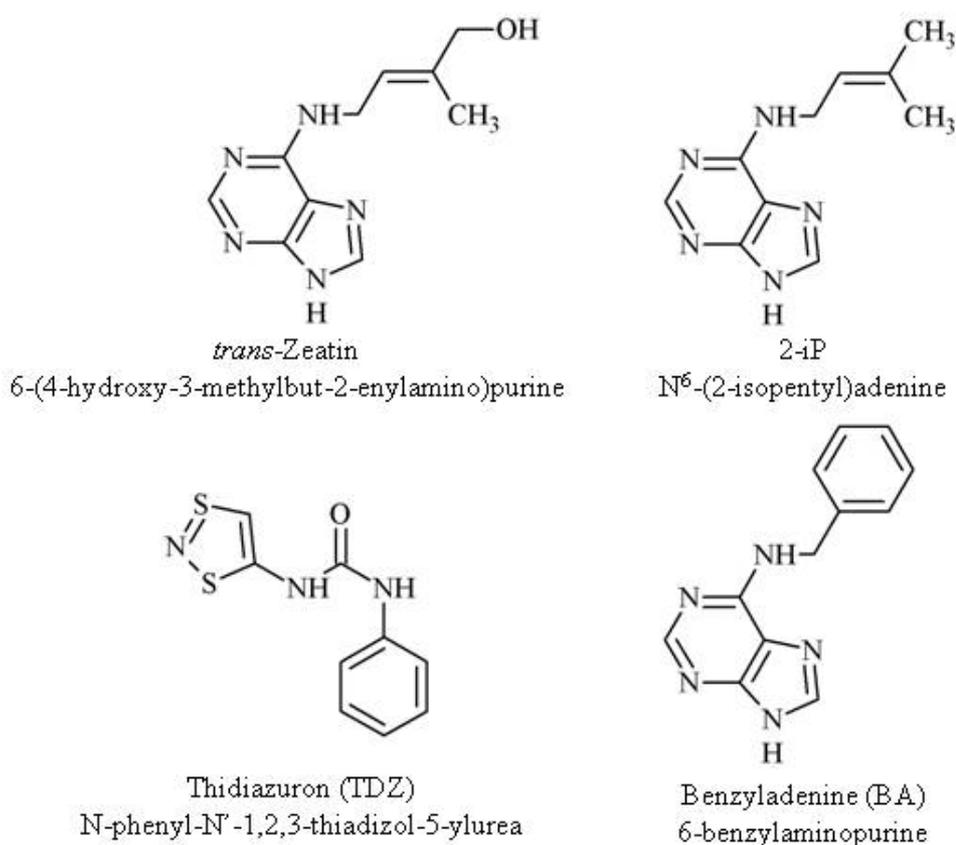


Рис. 7. Регуляторы роста растений цитокининового ряда, наиболее часто используемые в культуре ткани: зеатин (Zea); изопентиладенин (2-iP); тидиазурон (ТДЗ); бензиладенин (BA)

Цитокинины образуются в корнях и пассивно передвигаются по ксилеме в надземные органы. Высокое содержание цитокининов отмечено в апикальных клетках побега и корня. Цитокинины играют большую роль в различных процессах, включая стимуляцию деления клеток и их дифференциацию, инициацию и развитие побегов, снятие апикального доминирования, активацию притока метаболитов (аттрагирующий эффект), развитие проводящей системы и др.

В культуре ткани использование экзогенных цитокининов позволяет снять эффект апикального доминирования и добиться пролиферации побегов за счет активации пазушных меристем, индукции развития адвентивных побегов. В последнее время в качестве эффективного триггера морфогенеза широко используется синтетический регулятор роста – тидиазурон (ТДЗ). Несмотря на то, что химическая формула ТДЗ кардинально отличается от формул ауксинов и цитокининов этот регулятор роста обладает как цитокининовым, так и ауксиновым действием (Murthy et al., 1998; Guo, 2011). ТДЗ, относящийся к группе веществ фенилзамещенных мочевины (см. рис. 7), изначально использовались как дефолиант хлопка, в настоящее время, это соединение широко применяется в культуре изолированных тканей и органов растений (Mok, 1982; Burkhardt, 1990; Preece et al., 1991). Интерес к этому регулятору роста обусловлен его способностью к инициации морфогенного ответа в культуре древесных растений обладающих низкой регенерационной способностью (Lu, 1993; Huettelman, Preece, 1993).

Благодаря высокой способности стимулировать пролиферацию побегов, ТДЗ используют для микроразмножения широкого круга древесных растений. У древесных растений зачастую существуют трудности с развитием пазушных побегов в культуре *in vitro* при использовании цитокининов аминопуринового ряда, в силу сохранения сильного апикального доминирования и, как следствие, моноподиального нарастания. В таких случаях ТДЗ применяют как альтернативный регулятор роста, усиливающий пролиферацию побегов (Huettelman, Preece, 1993). Однако, время обработки и концентрацию ТДЗ в пита-

тельной среде необходимо подбирать с учетом высокой вероятности развития не только адвентивных побегов, но каллуса, что может привести к проявлению соматклональной изменчивости.

ТДЗ стимулирует широкий круг физиологических реакций у различных групп растений (Li, 2000; Hosseini-Nasr, 2000; Svetla, 2003, Matand, 2007). Причины высокой активности ТДЗ, вероятно, связаны с устойчивостью этого соединения в питательной среде и в тканях растения, последнее обусловлено устойчивостью этого соединения к ферментативному окислению. В экспериментах с мечеными атомами было отмечено накопление ТДЗ в каллусе бобовых растений (Mok, 1985). Способность ТДЗ индуцировать соматический эмбриогенез, тесно связана с его влиянием на метаболизм эндогенных регуляторов, в частности ауксинов. (Sreenivasu, 1998; Murthy et al., 1999; Nhut et al., 2006). Кроме того, установлено, что обработка ТДЗ соматических эмбриоидов и тканей растений *in vitro* усиливает накопление и транспорт эндогенных ауксинов (Murch, Saxena, 2001 a, b). Также ТДЗ способствует изменению биосинтеза цитокининов: происходит уменьшение содержания эндогенного 2-иР, при этом повышаются концентрации других пуриновых метаболитов (Victor, 1999; Zhang et al., 2005). Воздействие ТДЗ на метаболизм цитокининов связано с увеличением транспорта пуриновых оснований (Capelle, 1983; Laloue, 1989). Таким образом, эффективность ТДЗ при индукции морфогенеза проявляется опосредованно и обусловлена его влиянием на уровень эндогенных регуляторов роста.

Под действием ТДЗ эффективное снятие апикального доминирования и пролиферация пазушных побегов происходит при более низких концентрациях, чем при использовании цитокининов пуринового ряда. Рекомендованные концентрации ТДЗ для микроразмножения древесных растений лежат в пределах 1,0 нМ до 10,0 мкМ (Ashby, 1987; Huetteman, 1988; Briggs, 1988; Huetteman, Preece, 1993). В зависимости от концентрации ТДЗ в питательной среде морфогенез может протекать по пути образования каллуса, развития адвентивных и пазушных побегов или соматического эмбриогенеза. ТДЗ при

концентрации больше чем 0,1 мкМ стимулирует образование каллуса из эксплантов многих видов древесных растений (Huetteman, Preece, 1993; Zhang, 2005; Rosu, 2010). Существует много сведений о регенерации побегов под действием 0,1–20,0 мкМ ТДЗ у различных видов растений (Kim et al., 1997; Thomase, 2005, Rey, 2010). В большинстве случаев низкие концентрации способствуют развитию пазушных побегов, а высокие стимулируют закладку адвентивных почек. Сочетание ТДЗ с ИУК в индукционной среде усиливает регенерацию побегов (Murthy et al., 1998).

В последнее время ТДЗ в сочетании или без других регуляторов роста часто используют для стимуляции соматического эмбриогенеза в культуре ткани (Murthy et al., 1998, Sreenivasu, 1998; Nhut et al., 2006). Для запуска программы дедифференциации компетентных клеток необходимы низкие концентрации ТДЗ (от 0,5 до 10,0 мкМ), при этом у некоторых видов наряду с эмбриоидами, одновременно закладываются адвентивные побеги (Fiola, 1990; Bates, 1992; Jones et al., 2007 a, b).

Наряду с очевидными преимуществами использования ТДЗ, существует ряд негативных эффектов, которые возникают при культивировании растений в условиях *in vitro* под действием этого регулятора роста. Отмечено, что ТДЗ, стимулируя пролиферацию побегов, ингибирует их элонгацию. Для элонгации укороченные побеги, полученные под действием ТДЗ, переносят на среды без гормонов или с пониженным содержанием регуляторов роста (Russell, 1986; Fasolo et al., 1989; Preece et al., 1991b). Альтернативный метод элонгации побегов, основанный на культивировании побегов на ТДЗ-содержащей питательной среде при низких температурах, предложен Б.А. Бриггсом для рододендронов (Briggs, 1988). При переносе таких клонов в стандартные условия, после двух месяцев «холодного» культивирования, побеги быстро удлинялись и приобретали нормальное строение.

Культивирование на средах с ТДЗ чаще, чем при использовании других цитокининов, приводит к витрификации побегов, изменению морфологии листовой пластинки и срастанию побегов (Nieuwkerk, 1986; Briggs, 1988; Preece

et al., 1991b; Huettman, Preece, 1993). Эти проблемы решаются, как и в случае с угнетением элонгации, при переносе регенерантов на среды без регуляторов роста.

Укоренение микроклонов после размножения с использованием цитокининов и синтетических регуляторов роста растений, таких как ТДЗ, зачастую затруднительно. Так, снижение частоты укоренения микрочеренков, обработанных ТДЗ, отмечено у некоторых видов рода *Rhododendron* (Preece et al., 1991 a) и *Vitus* (Gray, 1991). Низкая способность к укоренению связана с высокой цитокининовой активностью и устойчивостью ТДЗ в тканях растений. Однако, у некоторых видов, размноженных при помощи ТДЗ, процессы ризогенеза не ингибируются (Fasolo et al., 1989; Yusnita, 1990; Preece et al., 1991 a, Ramapayake et al., 2006).

Таким образом, ТДЗ – это одно из наиболее перспективных соединений цитокининового действия, которое используется в культуре *in vitro* для микроразмножения многих видов рододендронов и других древесных растений, трудно размножающихся при использовании обычных регуляторов роста. К эффектам ТДЗ относят: повышение всхожести семян (Gabbar et al., 1993), раннее развитие проростков (Murthy et al., 1995), активацию пазушных меристем (Wang et al., 1986; Coleman, Estabrooks, 1992), индукцию развития адвентивных побегов, инициацию дедифференциации клеток их пролиферацию, запуск процессов формирования соматических зародышей из клеток вегетативных органов растения (Murthy et al., 1998). Под действием ТДЗ размножение происходит быстрее, эффективные концентрации ТДЗ в 10–1000 раз меньше, чем у цитокининов пуринового ряда. Однако, для преодоления аномалий развития регенерантов, возникших под действием ТДЗ в культуре *in vitro*, необходима элонгация полученных микропобегов. В связи с этим протокол на этапе собственно микроразмножения с использованием ТДЗ должен быть двухстадийным, то есть включать регенерацию побегов и последующую их элонгацию.

1.5. Инициация процессов морфогенеза *in vitro* из листовых эксплантов

Тотипотентность соматических растительных клеток в полной мере проявляется в культуре изолированных листовых эксплантов. Отсутствие у листа меристем, подобных апикальным, дает возможность индуцировать в культуре *in vitro* весь спектр морфогенных путей регенерации (Iapichino et al., 1991; Mertens et al., 1996; Samyn et al., 2002; Mithila et al., 2003; Gueye et al., 2009; Ranyaphia et al., 2011). Возможность индуцировать необходимый путь получения растений-регенерантов открывает широкие возможности применения культуры листовых эксплантов. Культура листовых эксплантов может служить моделью для изучения таких фундаментальных аспектов морфогенеза как изучение и детализация последовательности морфогенетических событий, установление, определение и оптимизация факторов влияющих на путь морфогенеза.

В настоящее время существует большое количество исследований посвященных введению в культуру *in vitro* листовых эксплантов. Для этого с одинаковым успехом используют маточные растения, выращиваемые в теплице, открытом грунте и растения из культуры *in vitro*. Листья, изолированные от растений, культивируемых *in vitro*, легче поддаются дальнейшим трансформациям (Mithila et al., 2003).

Немаловажным фактором, оказывающим влияние на индукцию побегов, является возраст листа: чем моложе лист, тем больше его морфогенные потенции (Бутенко, 1964, 1990, 1999; Высоцкий, 1986). Так, для регенерации адвентивных побегов из листовых эксплантов *Gypsorhila paniculata*, брали первые два наиболее молодых листа (Zuker et al., 1997). Именно молодые сформированные листья обладают наибольшей отзывчивостью на действие экзогенных стимулов (Khan et al., 2009).

Листовые экспланты, изолированные из растений открытого грунта или выращиваемых в теплицах, стерилизуют в 70% спирте с последующей обработкой соединениями хлора и трехкратной промывкой в дистиллированной

воде (Tomson, Gertner, 2003; Ranyapha et al., 2011).

Существует ряд исследований, касающихся морфогенетического потенциала различных зон листа (Iapichino et al., 1991, Mertens et al., 1996). Для исследования степени отзывчивости частей листа *Rhododendron laetum* × *aurigeranum* были выбраны листья, изолированные из растений, содержащихся в культуре *in vitro*. На среду Андерсона (Anderson, 1984) дополненную разными концентрациями индолилуксусной кислоты (ИУК) и 2-изопентиладенина (2-иР) помещали целые листья с черешком, листовые полоски 3 × 3 мм нарезанные перпендикулярно главной жилке и листовые секции 5 × 3 мм с нижней половины листа с удаленным черешком. Результаты оценивали, когда вновь образовавшиеся побеги достигли 2 мм в высоту.

Авторами показано, что регенерация из целых листьев единична и требует длительного культивирования. Регенерационный потенциал листовых секций намного больше, чем у листовых полосок. Наиболее отзывчивой частью листа является его основание около центральной жилки с черешком или без него (Iapichino et al., 1991). Эти данные подтверждены исследованиями, полученными с использованием листовых эксплантов *Rhododendron simsii* (Mertens et al., 1996), *Gypsorhila paniculata* (Zuker et al., 1997) и яблони cv. *Topred* (Yancheva et al., 2003).

Положение листа на среде для культивирования имеет решающее значение. Вертикальное положение листового экспланта может привести к формированию корней или вообще к отсутствию морфогенного ответа, в то время как горизонтальное положение экспланта способствует пролиферации и образованию регенерантов (Iapichino et al., 1991).

При горизонтальном положении листа на культуральной среде важно, какой стороной (абаксиальной или адаксиальной) эксплант соприкасается со средой. В работах К.Х. Ло с соавторами (Lo et al., 1997 a, b) детально изучены гистологические изменения листовых дисков *Saintpaulia ionanta*. Установлено, что при положении экспланта адаксиальной стороной на питательную среду, центры меристематической активности (меристематические) формируются

в эпидермальных слоях абаксиальной и адаксиальной сторон листа. В то время как культивирование на абаксиальной стороне приводит к закладке меристематических только на адаксиальной стороне (Lo et al., 1997 a). Е.Ю. Хан с соавторами (Khan et al., 2009) показали успешную регенерацию побегов *Citrus sinensis* (L.) Osbeck из листовых эксплантов, расположенных на поверхности среды адаксиальной стороной (Khan et al., 2009). При этом установлено, что регенерационный потенциал увеличивается, если экспланты контактируют со средой абаксиальной стороной (Lo et al., 1997 b). Исследования других авторов доказывают справедливость этого утверждения: для видов рода *Rhododendron* (Samyn et al., 2002; Tomsone, Gertnere, 2003; Pavingerova, 2009), для рода *Rubus* (Meng et al., 2004), для *Elliotia ractmosa* (Woo, Wetzstein, 2008 a) и др.

Влияние регуляторов роста на пути морфогенеза в культуре листовых эксплантов

При помощи варьирования регуляторов роста в питательной среде у листовых эксплантов можно вызвать различные пути морфогенеза: каллусогенез, соматический эмбриогенез, образование побегов или корней.

Данные о регуляции морфогенеза листовых эксплантов *Rhoenix dactylifera* свидетельствуют о том, что из одного типа клеток происходит либо ризогенез, либо каллусогенез. При высоких концентрациях нафтилуксусной кислоты (НУК 54,0 мкМ) образуется каллус, а при низких (1,0 мкМ) – корни (Gueye et al., 2009). Эти данные подтверждают предположение о том, что один и тот же тип клеток может стать тотипотентными или плюрипотентными под воздействием экзогенных ауксинов (Verdeil, 2007), и согласуется с теорией М.Л. Христиансона и Д.А. Ворника (Christianson, Warnik, 1983). Следовательно, ауксины не только способствуют активной пролиферации клеток экспланта и формированию морфогенной компетенции, но и определяют индукцию того или иного пути морфогенеза.

Индуктировать прямую регенерацию побегов из листовых эксплантов позволяет и оптимальное соотношение цитокининов и ауксинов в среде. Это соотношение имеет видоспецифичный характер. Однако, чаще встречаются сообщения об успешной прямой регенерации при соотношении цитокининов и ауксинов в среде от 1:1 до 5:1 (Iapichino et al., 1992; Samyn et al., 2002; Ranyaphia et al., 2011).

Одним из возможных путей морфогенеза в культуре листовых эксплантов является непрямой путь, когда на первом этапе получают каллус, а затем, изменяя состав среды, добиваются регенерации побегов. Подобные схемы культивирования использовались для сортов и видов рода *Rhododendron* (Preece, Immel, 1991; Mertens et al., 1996; Samyn et al., 2002). На первой ступени из листовых эксплантов на среде с высоким содержанием ауксинов (ИМК, ИУК, 2,4-Д) и низким содержанием цитокининов инициировали образование каллуса. Затем образовавшийся каллус переносили на среду с цитокининами без ауксинов, и таким образом достигалась регенерация побегов. В качестве цитокининов использовали ТДЗ и зеатин. Оказалось, что ТДЗ намного чаще вызывает регенерацию побегов из каллуса, чем зеатин (Mertens et al., 1996).

Цитокинины играют важную роль в определении судьбы клеток листовых эксплантов. Выбор цитокининов зависит от видовой специфичности экспланта. Для видов рода *Rhododendron*, например, используют 2-*iP*, зеатин и ТДЗ. Поскольку ТДЗ существенно усиливает способность клеток к пролиферации, то важным моментом для стимуляции прямого развития адвентивных побегов является определение оптимальной концентрации этого регулятора роста в индукционной среде (Yancheva et al., 2003; Pavingerova, 2009; Ranyaphia, 2011). Наиболее частые концентрации ТДЗ, которые используют в культуре *in vitro* как у древесных, так и травянистых растений, лежат в пределах от 0,5 до 10 мкМ. Именно при таких концентрациях ТДЗ показывает наибольшую эффективность среди регуляторов роста с цитокининовой активностью традиционно используемых в системах *in vitro* (Mertens et al., 1996).

В культуре листовых эксплантов *Saintpaulia ionantha* продемонстрирована способность ТДЗ индуцировать регенерацию из одного и того же типа тканей одновременно через прямой органогенез и прямой соматический эмбриогенез (Mithila et al., 2003). Листовые экспланты *S. ionantha* содержали на питательной среде с добавлением различных концентраций ТДЗ (0–10 мкМ) в течение 3, 6 и 9 дней. Затем переносили на безгормональную среду и культивировали до 36 дней. Дальнейший гистологический анализ показал, что на поверхности эксплантов одновременно формируются побеги и соматические эмбриониды. Причем преобладание числа побегов или соматических эмбрионов зависело от концентрации ТДЗ: при высоких концентрациях ТДЗ (5,0–10,0 мкМ) морфогенез чаще проходил по пути соматического эмбриогенеза, а при низких (0,5–2,5 мкМ) – происходил органогенез (Mithila et al., 2003). Известно, что для инициации соматического эмбриогенеза необходимо присутствие в питательной среде экзогенных ауксинов. Способность ТДЗ к индукции соматического эмбриогенеза доказывает его влияние на метаболизм эндогенных ауксинов (Hutchinson et al., 1996 a, b; Murthy et al., 1998; Mithila et al., 2003). Таким образом, ТДЗ способствует дедифференциации клеток эксплантов и в зависимости от концентрации этого регулятора роста в индукционной среде судьбу компетентных клеток, которая может быть реализована через органогенез или соматический эмбриогенез.

Для некоторых видов растений присутствие в питательной среде только ТДЗ вызывает морфогенетический ответ. Однако, существуют данные о видах древесных растений, которые проявляют «стойкость» на воздействие ТДЗ. В таких случаях добиться пролиферации побегов можно либо через индукцию каллусообразования (Samun et al., 2002), либо посредством использования кратковременного воздействия ауксинами. Кратковременная обработка ауксинами предпочтительней, поскольку, в таком случае активизируется дедифференциация клеток листового экспланта, но каллус не образуется. В связи с видоспецифичным действием ТДЗ в некоторых случаях все же необходимо использовать сочетание этого регулятора роста с ауксинами для усиления

степени морфогенной отзывчивости листовых эксплантов (Yancheva et al., 2003). С.Д. Янчевой с соавторами (2003) установлено, что для увеличения выхода регенерантов из листовых эксплантов яблони сорта Torped необходима комбинация ТДЗ с ауксинами. При этом показана эффективность использования кратковременной (до 6 дней) обработки ТДЗ в сочетании с 2,4-дихлорфеноксисукусной кислотой (2,4-Д) или ИМК в качестве стимулов к дедифференциации клеток листовых эксплантов. Авторы отметили существенное сокращение времени культивирования и повышение интенсивности пролиферации после предобработки ТДЗ в комбинации с 2,4-Д по сравнению с ИМК. При этом короткая предобработка способствовала не только усилению пролиферации, но и появлению «окна для определения судьбы клеток» необходимого для индукции процессов регенерации побегов. В связи с этим авторы приходят к выводу, что тип ауксинов – критический фактор для выражения потенций растительных клеток листовых эксплантов (Yancheva et al., 2003).

Гистологический анализ морфогенеза в культуре листовых эксплантов

Для уточнения путей морфогенеза в культуре листовых эксплантов необходим детальный гистологический анализ. Многочисленные гистологические исследования разных авторов показывают, что адвентивные побеги или соматические эмбриоиды, полученные из листовых эксплантов, редиференцируются из дедифференцированных эпидермальных клеток (Lo et al., 1997 a, b; Woo, Wetzstein, 2008 b; Mithila et al., 2003). Однако существуют и другие данные о том, что начальные этапы морфогенеза в культуре листовых эксплантов *Rhoenix dactylifera* происходят за счет клеточных делений в проводящих периваскулярных узлах (Gueye et al., 2009).

Гистологический анализ морфогенеза из клеток листовых эксплантов, проведенный во многих исследованиях, также подтверждает описанную выше теорию М.Л. Христиансона и Д.А. Ворника (1983). Ранние этапы этих процессов при гистологическом анализе имеют сходную картину. Процесс

дедифференциации запускается с момента изоляции экспланта. Происходит возврат в состояние большей физиологической пластичности (Trigiano, Gray, 2005).

Начальные стадии морфогенеза из листовых эксплантов детально установлены на примере *Saintpaulia ionantha* (Lo et al., 1997 a, b; Mithila et al., 2003). Изучая морфогенез листовых эксплантов фиалок К.Х. Ло с соавторами (1997) дополнили теорию М.Л. Христиансона и Д.А. Ворника (1983). Ими установлено, что предобработка листьев на безгормональной среде в течение 5 дней с последующим переносом на индукционную среду, сокращает время появления морфогенного ответа. Без предобработки эксплантам требовалось больше времени на трансформацию. Первые периклиналильные деления эпидермальных клеток в листьях без предобработки появились только через 3-5 дней на индукционной среде. В то время как после 5 дней предобработки клеточные деления возникали на 2-й день после переноса на среду содержащую гормоны. Эти наблюдения позволили авторам прийти к выводу о том, что эпидермальные клетки не способны делиться в течение первых дней даже под действием экзогенных гормонов (Lo et al., 1997 b).

Таким образом, авторы пришли к выводу о существовании предкомпетентного периода, который, по их мнению, состоит из двух фаз: фазы реактивации и фазы дедифференциации. Фаза реактивации длится около 3 дней. В это время не требуются экзогенные гормоны, однако, для последующей дедифференциации клеток гормоны необходимы. Предполагается, что в период реактивации клетки приобретают чувствительность к действию гормонов, как сигналу для дальнейшей дедифференциации и последующей индукции органогенеза (Lo et al., 1997 b).

В процессе дедифференциации под действием регуляторов роста клетки эпидермы и мезофилла многократно делятся. Эксплант увеличивается в размерах за счет увеличения числа клеточных слоев. Периклиналильные деления эпидермиса приводят к образованию компетентных клеток для индукции побегов. Затем наряду с периклиналильными делениями происходят антиклиналиль-

ные деления, в результате образуется клеточный центр деления или меристемоид (Lo et al., 1997 a).

Деление клеток меристемоида физически ограничено плотно прилегающими слоями увеличенных клеток мезофилла, поэтому клетки центра деления мелкие, приподнимаются над поверхностью экспланта и образуют выпячивания (Woo, Wetzstein, 2008 b). Их развитие приводит к формированию сферических, а затем – сердцевидных структур. Однако на этих этапах еще нельзя с уверенностью определить путь морфогенеза, поскольку ранние стадии органогенеза и соматического органогенеза имеют гистологическое сходство. В связи с этим необходимо анализировать гистологический материал на протяжении всего периода морфогенеза (Yancheva et al., 2003; Woo, Wetzstein, 2008 b). Наиболее информативны в этом смысле более поздние стадии, когда сформирована проводящая система регенеранта. Отличительной особенностью соматических эмбриоидов является их полярная структура и автономность собственной проводящей системы. Эмбриоид на поздней стадии развития имеет два полюса зон меристематической активности: апекс побега и корневой апекс (Kurczyska et al., 2007).

1.6. Особенности клонального микроразмножения рододендронов

Клональное микроразмножение рододендронов также состоит из 4 этапов, каждый из которых имеет свои особенности и определяется генотипом растения и типом экспланта.

Интактные растения, произрастающие в открытом грунте или в теплицах, являются основными источниками материала для введения в культуру. В качестве эксплантов используют неодревесневшие побеги, листья, почки, меристемы, части цветков и семена. Однако, чаще всего при микроразмножении рододендронов используют микрочеренки, в этом случае *de novo* побеги образуются за счет активации пазушных меристем.

Сроки изоляции исходного материала выбирают исходя из типа экс-

плантов (почка, лист, части цветка, семена и т.д.). Для видов рода *Rhododendron* характерно повышенное содержание фенольных соединений. В этой связи, материал для введения в культуру рододендронов, как и других древесных растений, следует изолировать весной в период выхода из физиологического покоя, то есть в начале активного роста, или осенью, когда уже сформированы почки следующего года (Brand, Lineberger 1992). Оптимальными сроками для изоляции эксплантов рододендронов является май и октябрь, поскольку именно в эти месяцы отмечен минимум сезонного накопления фенольных соединений (Васильева, 2009), ферментативное окисление которых существенно снижает жизнеспособность эксплантов на этапе введения в культуру.

На этапе собственно микроразмножения используют среду Андерсона (AM), Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962), питательную среду для древесных растений (WPM) (Lloyd, McCown, 1980) или среду по прописи Эконому и Райда (EM) (Economou, Read, 1984). Традиционно используемые регуляторы роста – 2-иР и ИУК (табл. 1). Зеатин также эффективно повышает регенерационный потенциал и число побегов на эксплант, а в последнее время часто используют и ТДЗ. Период субкультивирования на питательных средах содержащих регуляторы роста составляет 6-8 недель.

Таблица 1

Протоколы для *in vitro* размножения некоторых генотипов рода *Rhododendron* (Eeckhaut, 2010)

Генотип	Эксплант	Среда для микроразмножения	Ссылки
Вечнозеленые виды и сорта	меристемы	1/10 MS + 2–5 мг/л BA + 20 г/л сахарозы	Preil, Engelhardt, 1977
Разные генотипы	побеги	WPM + 1,6–3,2 мг/л 2-иР	McCown, Lloyd, 1983
Вечнозеленые виды и сорта	побеги	1/10 MS + 245 мг/л K ₂ HPO ₄ + 250,0 мг/л KNO ₃ + 600,0 мг/л MgSO ₄ + 20,0 г/л сахарозы + 2,25 мг/л BA	Dabin, Bouharmont, 1983
Листопадные виды и сорта	побеги	EM + 1,0 мг/л ИУК + 5,0 мг/л 2-иР	Economou, Read, 1984
R. «PJM» hybrids	побеги	AM + 1,0–2,0 мг/л 2-иР (pH 6,0)	Ettlinger, Preece, 1985
<i>R. prinophyllum</i>	Побеги	EM + 1,0 мг/л ИУК + 5,0 мг/л	Dai et al., 1987

		2-іР	
<i>R.</i> «Petrick» <i>R.</i> «Rex»	побеги	ЕМ (sequestrene) + 10,0 мг/л 2-іР + 0,9 мг/л ИУК	Radice, Caso, 1990
<i>R.</i> «President Roosevelt»	Вегетативные и цветочные почки, побеги	WPM + 8,12 мг/л 2-іР + 1,5 г/л гельрита	Pogany, Lineberger, 1990
<i>R. laetum</i>	побеги	AM + 15,0 мг/л 2-іР	Iapichino, Chen, Fuchigami, 1991
<i>R.</i> «Montego»	побеги	WPM + 2,0–10,0 мг/л 2-іР	Brand, Kiyomoto, 1997
Вечнозеленые виды и сорта	побеги	1/2 AM + 0,05 мг/л ТДЗ + 0,5 мг/л зеатина	Hsia, Korban, 1997
<i>Menziesia</i> × VGE	проростки	AM + 10,0 мг/л 2-іР + 3,0 г/л геллановой камеди	Kita et al., 2005
<i>R. maddenii</i>	побеги	AM + 2,0 мг/л 2-іР + 0,1 мг/л НУК	Tiwari, Chauhan, 2006

Укоренение и адаптация наиболее ответственный этап микроразмножения рододендронов. Для стимуляции ризогенеза используют ауксины, ИУК или ИМК, которые добавляют в среду Андерсена (табл. 2). При этом процесс укоренения занимает 2–3 месяца.

Таблица 2

Протоколы для укоренения некоторых представителей рода *Rhododendron* (Eeckhaut, 2010)

Генотип	Состав питательной среды	Ссылки
Вечнозеленые виды и сорта	1/10 MS + 2,0 мг/л ИУК + 2,5 г/л активированного угля	Preil, Engelhardt, 1977
Вечнозеленые виды и сорта	1/10 MS + 20,0 г/л сахароза + 2,0 мг/л ИУК + 2,5 г/л активиро- ванного угля	Mertens et al., 1996
Вечнозеленые виды и сорта	1/10 MS + 245,0 мг/л КН ₂ РО ₄ + 250,0 мг/л КНО ₃ + 600,0 мг/л MgSO ₄ + 20,0 г/л сахароза + 1,75 мг/л ИУК + 0–3 г/л активиро- ванного угля	Dabin, Bouharmont, 1983
<i>R. catawbiense</i>	1/2 AM + 20 г/л сахарозы + 2–4 мг/л ИУК или ИМК + 1 г/л активированного угля	Meyer, 1982
Листопадные виды и сорта	1/2 EM + 1–4 мг/л ИУК или ИМК	Economou, Read, 1984
<i>R.</i> «Petrick» <i>R.</i> «Rex»	EM (sequestrene) + 20 г/л	Radice, Caso, 1990

	сахарозы	
<i>R. prinophyllum</i>	1/2 EM + 20 г/л сахарозы + 1–4 мг/л ИУК или ИМК + 1 г/л активированного угля	Samyn et al., 2002
<i>Menziesia</i>	AM + 3 г/л желлановой камеди	Kita et al., 2005
<i>R. ponticum</i>	AM (1/2 макросоли)	Almeida, 2005

Одним из эффективных способов индукции ризогенеза является короткая обработка высокими концентрациями ауксинов с последующим укоренением на безгормональной АМ или непосредственно в почвенном субстрате, смеси торфа и песка в условиях *ex vitro* (табл. 3).

Таблица 3

Индукция ризогенеза у представителей рода *Rhododendron* при помощи импульсной обработки высокими концентрациями ауксинов

Генотип	Ауксины	Время обработки	Среда для ризогенеза	Ссылки
<i>R. ponticum</i>	1 г/л ИМК	1 мин	торф :песок (2:1)	Almeida, 2005
<i>R. ponticum</i>	500 мг/л ИУК	10–15 с	торф:песок (3:1)	Cantos, 2007
Вечнозеленые виды и сорта	30 мг/л ИМК	15 мин	торф:перлит (9:1)	Vejsadová, 2008
<i>R. ledebourii</i> <i>R. smirnowii</i> <i>R. luteum</i>	30 мг/г ИМК	4 часа	АМО	Васильева, 2009

Особенности регенерации побегов из листовых эксплантов представителей рода *Rhododendron*

Использование листа в качестве экспланта позволяет решить не только проблемы связанные с микроразмножением существующих видов и сортов представителей рода *Rhododendron*, но и создать системы регенерации для воспроизводства новых ценных генотипов, полученных вследствие агробактериальной трансформации.

Для изоляции листовых эксплантов рододендронов выбирают верхнюю пару листьев. Экспланты помещают на питательные среды горизонтально адаксиальной стороной листа вверх (Samyn et al., 2002; Tomson, Gertner,

2003; Pavingerova, 2009). Наиболее морфогенной частью листовых эксплантов рододендронов считается основание листа – область возле черешка и главной жилки листовой пластины (Mertens et al., 1996).

В культуре листовых эксплантов возможны различные пути морфогенеза. Для листовых эксплантов рододендронов разработаны в основном двухступенчатые системы регенерации, включающие стадию каллусообразования и регенерацию побегов из каллусов (табл. 4). Такие системы снижают вероятность стабильного воспроизводства заданных генотипов вследствие проявления соматональной изменчивости. В литературе описаны способы индукции прямого органогенеза побегов у отдельных генотипов при использовании ТДЗ, однако эти данные касаются в основном вечнозеленых представителей рода (Tomson, Gertnet, 2003).

Таблица 4

**Способы индукции морфогенеза из листовых эксплантов
представителей рода *Rhododendron***

Вид, сорт	Эксплант	Состав питательной среды	Особенности морфогенеза	Ссылки
<i>R. laetum</i> × <i>aurigeranum</i>	Сегменты листа (2 мм) обрезанные перпендикулярно главной жилке	AM + 22,8 мкМ ИУК + 147,6 мкМ 2-иР	Непрямой органогенез	lapachino et al., 1991
<i>R. hybrids</i> (“Ivory Coast”, “Lodestar”, “Joe Paterno”, “Cunningham’s White”) <i>R. catawbiense</i> “Album”	Сегменты листа (3-5 мм) обрезанные перпендикулярно главной жилке	AM + 4,9 мкМ ИМК + 73,8 мкМ 2-иР	Прямой органогенез	lapachino et al., 1992
<i>R. simisii</i> “Hellmut Vogel”	Основание листовой пластинки с черешком	1) AM + 9,0 мкМ 2,4-Д (или 5,4 мкМ НУК); 2) AM + 9,0 мкМ ТДЗ (или 68,0 мкМ зеатина)	1) каллусогенез 2) органогенез	Mertens et al., 1996
<i>R. simisii</i>	Целый лист с черешком	МС + 2,0 мкМ НУК + 9,0 мкМ ТДЗ	Прямой органогенез	Samyn et al., 2002

<i>R. catawbiense</i>	Целая листовая платина	AM + 1,0–3,0 мг/л ИМК + 12,0–15,0 мг/л 2-iP + 0,5–1,5 мкМ ТДЗ	Прямой орга- ногенез	Tomsone, Gernete, 2003
<i>R. "Nova Zembla", Azurro", "America" и др.</i>	Половинки листа	AM + 0,57 мкМ ИУК + 1,2 мкМ ТДЗ	Непрямой ор- ганогенез	Pavingerova, 2009
<i>R. catawbiense "Grandiflorum"</i>	Половинки листа	AM + 5,7 мкМ ИУК + 0,45 ТДЗ	Непрямой ор- ганогенез	Pavingerova, 2009
<i>R. "Fragrantissimum Improved"</i>	Сегменты листовой пластины по 5 мм ²	AM + 10,0 мкМ ИУК + 8,8 мкМ ТДЗ	Непрямой ор- ганогенез	Herbert et al., 2010

Инициация регенерации из флоральных эксплантов рододендронов

Экспланты, изолированные из цветков рододендронов, имеют ряд преимуществ по сравнению с другими типами эксплантов, главными из которых являются низкий уровень контаминации бутонов и более продолжительный временной интервал для изоляции эксплантов из условий *ex vitro*.

Первый протокол микроразмножения с использованием изолированной завязи с цветоножкой разработан М.М. Майером в 1982 (Meyer, 1982) для *R. catawbiense* (табл. 5). Регенеранты были получены непрямым путем из изолированных завязей с цветоножкой (далее флоральный эксплант) под действием традиционно используемых для рододендронов регуляторов роста: 2iP (73,8 мкМ) и ИУК (22,8 мкМ). Прямой органогенез в культуре флоральных эксплантов представителей рода *Rhododendron* стал возможен при использовании ТДЗ в качестве регулятора роста. Так при культивировании изолированных пыльников *R. «P.J.M. hybrids»* на средах содержащих различные комбинации 2iP (10,0–25,0 мкМ) с ТДЗ (1,0–10,0 мкМ) были одновременно получены адвентивные побеги, флоральные структуры и каллус (Shevade, Preece, 1993; Huetteman, Preece, 1993).

Таблица 5

Способы индукции морфогенеза из флоральных эксплантов представителей рода *Rhododendron*

Вид, сорт	Тип экспланта	Среда	ТДЗ, мкМ	2-иР, мкМ	ИУК, мкМ	Особенности морфогенеза	Ссылки
<i>R. catawbiense</i>	завязь с цветоножкой	АМ	-	24,5–73,8	5,7–22,8	темнота 2–4 недели; органогенез через каллус	Meyer, 1982
<i>R. prinophyllum</i>	завязь	АМ	-	73,8	22,8	темнота, 1 месяц; органогенез через каллус	Dai et al., 1987
<i>R. «President Roosevelt»</i>	цветочные почки	АМ + 1,5 г/л гельбит	-	36,5	-	прямой органогенез	Pogany, Lineberger 1990
<i>R. «P.J.M. hybrids»</i>	тычиночная нить	АМ	1,0	25,0	-		Shevade, Preece, 1993
<i>R. «P.J.M. hybrids»</i>	пыльник; цветок; пестик;	АМ	1,0–10,0	10,0	10,0	при 20 мкМ ТДЗ – соматический эмбриогенез	Huetteman, Preece, 1993
Разные сорта	цветоножка	1) АМ 2) ЕМ или АМ	- - - - -	73,8 73,8 + 0,25 мг/л зеатина 19,7	22,8 22,8 11,4 11,4	1) темнота 3 недели; 2) свет	Bojarszuk, 1989
<i>R. «Irina»</i>	завязь с цветоножкой	АМ + 20,0 г/л сахароза + 10,0 г/л глюкоза	0,5–2,5	73,8	22,8	прямой органогенез	Tomson, 2004

Однако, наиболее удачный и часто используемый в настоящее время протокол был разработан с использованием флоральных эксплантов *R. «Irina»*, в котором показано, что добавление ТДЗ в базовую среду Андерсона, содержащую 2iP (73,8 мкМ) и ИУК (22,8 мкМ), индуцирует прямую регенерацию побегов непосредственно из тканей экспланта (Tomson, Gertner, 2003, Tomson et al., 2004).

Итак, представленный обзор литературы, касающийся различных аспектов клонального микроразмножения представителей рода *Rhododendron*, показал широкое использование этого подхода, позволяющего массово воспроизводить ценные генотипы. Однако, в основном эти исследования касаются видов и сортов вечнозеленых рододендронов, работы по размножению *in vitro* дикорастущих листопадных и полувечнозеленых представителей рода Азиатской части России либо единичны, либо по некоторым видам не проводились. Практически не изучен регенерационный потенциал различных типов эксплантов (листьев, флоральных органов) дикорастущих видов с помощью морфогистологического анализа. Выявление путей морфогенеза *in vitro* имеет теоретическое значение, так как вносит вклад в понимание фундаментальных основ биологии развития древесных культур.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в лаборатории биотехнологии Центрального сибирского ботанического сада СО РАН в 2011–2014 гг., с использованием оборудования ЦКП ЦСБС СО РАН.

В лаборатории биотехнологии в культуре *in vitro* поддерживается большая коллекция представителей рода *Rhododendron*, включающая 25 морозоустойчивых видов, сортов и гибридов. В открытом грунте коллекция морозоустойчивых вечнозеленых сортов рододендронов представлена в «Бонсай-парке» ЦСБС СО РАН.

2.1. Объекты исследования

В качестве объектов исследования использовали 3 дикорастущих вида рода *Rhododendron* (семена 2011 года сбора предоставлены Ботаническим садом-институтом ДВО РАН): *R. dauricum* L., *R. sichotense* Pojark, *R. schlippenbachii* Maxim. и 2 сорта: *R. catawbiense* «Grandiflorum» и *R. «Pohjola's Daughter»*. Выбор объектов для исследования обусловлен, главным образом, морозоустойчивостью и способностью произрастать в условиях юга Западной Сибири. Кроме того, сорта *R. catawbiense* «Grandiflorum», *R. «Pohjola's Daughter»* были использованы в качестве модельных объектов для выявления генетических различий вечнозеленых сортов и дикорастущих листопадных и полувечнозеленых видов произрастающих на территории азиатской России.

R. sichotense Pojark – дикорастущий ветвистый полувечнозеленый кустарник до 3 м высотой с темно-серой корой. Листья 2–4 см длиной и 1–2 см шириной. Листовая пластинка кожистая, толстоватая, сверху темная, оливково-зеленая, снизу – желто-зеленая, к осени бурая, с обеих сторон густо, особенно снизу, усаженная чашевидными округлыми железками без щетинистых волосков, лишь сверху по средней жилке очень коротко пушистая. Осенью листья темно-фиолетовые. Цветочные почки от 1 до 8 на концах прошлогодних побегов одноцветковые до 5 см в диаметре. Окраска венчика варьирует

от бледно-розовой и сиреневой до темно-розовой, малиновой и фиолетовой.

R. dauricum L. – зимостойкий, листопадный кустарник высотой 0,5–2,0 м. Листья удлинненно-овальные 1–3 см длиной. Молодые листья светло-зеленые, позднее буроватые, густо покрыты чешуевидными железками. Осенью зимующие листья скручиваются в трубочку. Другая часть листьев опадает. Цветочные почки по 1–3 у конца побегов. Венчик розовый с сиреневым оттенком, иногда белый до 4 см в диаметре. В природных условиях цветет с конца апреля по июнь.

R. schlippenbachii Maxim. – зимостойкий, листопадный раскидистый кустарник около 2 м высотой, реже до 5 м. Молодые побеги покрыты железистыми волосками, которые исчезают при одревеснении. Листья обратнойцевидные, мягкие, собраны по 5 на конце побегов, клиновидно-обратнойцевидные до 10 см в длину. Цветки по 3–6 с нежным ароматом, распускаются одновременно с листьями или раньше. Венчик бледно-розовый с пурпурными крапинками, реже белый, около 7–10 см в диаметре. Цветет с конца апреля по июнь.

R. catawbiense «Grandiflorum» – вечнозеленый, ветвистый кустарник 2–4 м высотой. Листья крупные эллиптической формы 7–15 см длиной, 3–5 см шириной, кожистые, глянцевые, сверху темно-зеленые, снизу бледные, с 16 парами хорошо выраженных жилок. Цветки по 15–20 собраны в крупные соцветия, 12–16 см в диаметре. Венчик сиренево-пурпурный с зелеными крапинками, около 6 см в диаметре. Тычинок – 10 с опушенными у основания нитями. Столбик голый. Благодаря наличию крупных соцветий и листьев *R. catawbiense* «Grandiflorum» обладает высокими декоративными качествами в любом онтогенетическом состоянии. (Петухова, 2006). *R. catawbiense* «Grandiflorum» – один из самых старых и известных сортов рододендронов, полученный еще в начале XIX в. путем гибридизации и отбора сеянцев дикорастущего вида *R. catawbiense*.

R. «Pohjola's Daughter» (или «Pohjolan Tytär») – морозоустойчивый, вечнозеленый плотный кустарник высотой до 1,3 м. Листья кожистые, блестящие, темно-зеленые. Бутоны фиолетовые. Цветки крупные светло-розовые,

более темные в середине. Соцветия плотные состоят из 15–20 цветков. Продолжительность жизни куста 30 лет. Цветет в первой половине мая, около 3 недель. *R. «Pohjola's Daughter»* – сорт финской селекции, полученный по программе размножения рододендронов Хельсинского Университета в результате скрещивания материнского сорта «Cunningham's White» (*R. caucasicum* × *R. ponticum*) с гибридом *R. smirnowii* произрастающим в знаменитом финском дендрарии «Мустила».

Источником эксплантов для экспериментов в культуре *in vitro* послужили семена дикорастущих видов *R. dauricum*, и *R. schlippenbachii* 2011 г. сбора, полученные из Ботанического сада-института ДВО РАН, микроклоны *R. sichotense* и *R. catawbiense* «Grandiflorum» из коллекции *in vitro* лаборатории биотехнологии ЦСБС СО РАН г. Новосибирск, а также горшечные растения *R. dauricum* и *R. sichotense*, выращиваемые в тепличном комплексе ЦСБС, и растения *R. «Pohjola's Daughter»*, произрастающие в открытом грунте «Бонсай-парка».

2.2. Материалы и оборудование для исследования в культуре *in vitro*

Экспериментальная работа выполнена на основе стандартных методов культуры изолированных клеток, тканей и органов растений (Бутенко, 1964, 1999; Калинин, 1980, 1992). Исследование проводили с использованием специальной посуды и оборудования.

Питательные среды и дистиллированную воду стерилизовали в автоклаве при давлении в одну атмосферу и температуре 120° С в течение 20 мин. Посуду стерилизовали в сухожарочном шкафу при температуре 220° С в течение 2 часов. Помещение для стерильных работ облучали ультрафиолетовыми лампами 20–30 мин. Все манипуляции с асептическими объектами проводили в ламинар-боксе БАВ нп-01-«Ламинар-С»-1,5 (Lamsystems, Россия), поверхности которого предварительно обрабатывали этиловым спиртом.

В качестве эксплантов использовали семена, части проростков, листья и фрагменты цветка (завязь с цветоножкой), причем экспланты изолировали как *in vivo* от интактных растений, произрастающих в открытом грунте и на территории тепличного комплекса ЦСБС, так и *in vitro* от микроклонов.

2.3. Стерилизация эксплантов

Режим стерилизации изолированных органов интактных растений разрабатывали в зависимости от типа экспланта.

Семена *R. dauricum* и *R. schlippenbachii* стерилизовали в растворе 20 % «Доместоса» (в пересчете – 0,2 % раствор натрия гипохлорита; Unilever, Россия), в течение 20 мин.

Стерилизацию бутонов *R. dauricum* и *R. sichotense* проводили в несколько этапов:

- погружение на 2 мин в 70 % этиловый спирт;
- замачивание на 15 мин в 5 % растворе «Доместоса»;
- стерилизация в 0,1 % растворе AgNO_3 в течение 15 мин.

Асептический материал промывали 3-кратно в стерильной дистиллированной воде.

2.4. Введение в культуру и микроразмножение исследуемых видов

Стерильные экспланты инокулировали на питательные среды, основой которых являлась смесь солей микро- и макроэлементов, дополненная углеводами, витаминами и регуляторами роста растений. Для введения в культуру *in vitro* и дальнейшего микроразмножения рододендронов использовали питательную среду АМ (Anderson, 1984) (табл. 6), дополненную 30,0 г/л сахарозы, 6,0 г/л Бактоагара (Panreac, Испания) (рН среды 5,0 до автоклавирования). Регуляторы роста добавляли в питательную среду после автоклавирования в стерильных условиях.

**Компонентный состав питательной среды по прописи Андерсона (AM)
(Anderson, 1984)**

Компоненты	Концентрация, мг/л
NH ₄ NO ₃	400,000
KNO ₃	480,000
MgSO ₄ *7H ₂ O	370,000
CaCl ₂ *2H ₂ O	440,000
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	380,000
Sequestren 138	100,000
MnSO ₄ *H ₂ O	16,900
ZnSO ₄ *7H ₂ O	8,600
H ₃ BO ₃	6,200
KI	0.300
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,250
i-inositol	100,000
Adenine sulfatе	80,000
Thiamin HCl	0,400

На этапе собственно микроразмножения для исследования регенерационного потенциала различных типов эксплантов использовали следующие регуляторы роста: ТДЗ, зеатин, 2-іР и ИУК (табл. 7).

Все регуляторы роста, включая ТДЗ, добавляли в питательные среды после автоклавирования. Культуры содержали под люминесцентными лампами с интенсивностью освещения $40 \text{ мкМоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ при 16-часовом фотопериоде и температуре $23 \pm 2^\circ\text{C}$. Для каждой обработки использовали по 10 эксплантов в трех повторностях. Изучение процессов морфогенеза в культуре *in vitro* проводили при помощи стереомикроскопа Carl Zeiss Stereo Discovery V 12 с цветной фотокамерой AxioVision 4.8 и программным обеспечением для приема, обработки и анализа изображений (Carl Zeiss, Germany).

**Регуляторы роста, используемые для индукции морфогенеза
из различных типов эксплантов**

Эксплант	Вид / сорт	ТДЗ, мкМ	Зеатин, мкМ	2-иР, мкМ	ИУК / ИМК, мкМ
Лист <i>in vitro</i>	<i>R. sichotense</i>	0,1–10,0; импульсная обработка 30,0*	- -	- -	- -
	<i>R. catawbiense</i> «Grandiflorum»	0,1–10,0 импульсная обработка 30,0*	- -	- -	- -
Семена	<i>R. dauricum</i>	1,0	-	-	-
		-	1,0–10,0	-	-
		-	5,0	-	5,0
	<i>R. schlippenbachii</i>	-	-	24,5	5,7
		1,0	-	-	-
		-	1,0 – 10,0	-	-
Флоральные экспланты	<i>R. «Pohjola's daughter»</i>	-	5,0	-	5,0
		-	-	24,5	5,7
		1,0	-	-	-
	<i>R. dauricum</i>	1,0–2,5	-	73,8	22,8
		1,0–5,0	-	-	-
		1,0–5,0	-	73,8	22,8
<i>R. sichotense</i>	1,0–5,0	2,5	-	-	
	1,0	1,0	-	-	
		1,0	2,5	-	-

Примечание. * – замачивание эксплантов в 30 мкМ ТДЗ в течение 4 часов.

Семена

Стерильные семена *R. dauricum* и *R. schlippenbachii* помещали по 60 штук в чашки Петри на поверхность водного раствора агара (0,6 %). Семена проращивали на свету, так как свет является триггером для прорастания *R. dauricum* (Кондратович, 1985; Николаева, 1985). При расчете всхожести проросшими считали семена, у которых появились семядоли. Энергию прорастания подсчитывали за 12 дней, интервал для расчетов выбран экспериментально, поскольку нет ГОСТа для показателей всхожести семян иссле-

двух видов рода *Rhododendron*.

В качестве эксплантов использовали проростки с удаленными корешками, которые переносили на агаризованные среды АМ, дополненные различными регуляторами роста. Испытывали влияние зеатина в концентрациях 1,0; 2,5; 5,0 и 10,0 мкМ, сочетания 5,0 мкМ зеатина с 5,0 мкМ ИУК и 1,0 мкМ ТДЗ (см. табл. 7).

В качестве контроля использовали АМ, содержащую 24,5 мкМ 2-іР и 5,7 мкМ ИУК.

Через 8 недель инокуляции эксплантов на питательные среды определяли частоту морфогенного ответа, коэффициент размножения и длину побегов. Подсчет числа побегов на эксплант, полученных под действием ТДЗ, был возможен только после дополнительной элонгации на безгормональной питательной среде (АМ0). Коэффициент размножения и высоту побегов в конгломератах подсчитывали через 8 недель элонгации.

Листовые экспланты

Микроклоны *R. catawbiense* «Grandiflorum» и *R. sichotense* поддерживаемые *in vitro* на среде АМ, содержащей 24,5 мкМ 2-іР и 5,7 мкМ ИУК, перенесли на АМ0 и культивировали в течение 2 пассажей.

Стерильные молодые листья микроклонов *R. catawbiense* «Grandiflorum» и *R. sichotense*, содержащихся на АМ0, использовали в экспериментах. Изолировали верхнюю первую пару листьев с черешком (листовые экспланты). Процесс изоляции проводили под стереоскопическим микроскопом, для исключения наличия остатков пазушных меристем на черешке листового экспланта.

Для индукции морфогенеза листовые экспланты помещали на поверхность АМ адаксиальной стороной вверх. Для исследования влияния ТДЗ на регенерационную способность и морфогенез использовали два способа обработки (см. табл. 7):

1) непосредственное культивирование эксплантов на АМ, дополненной различными концентрациями ТДЗ (0,1; 0,5; 1,0; 5,0 и 10,0 мкМ);

2) импульсную обработку листовых эксплантов в течение 4 часов в водном растворе 30,0 мкМ ТДЗ с последующим культивированием на безгормональной АМ.

Время культивирования составило 15 недель. Полученные конгломераты укороченных побегов переносили на АМ0 для элонгации побегов. Через 8 недель подсчитывали число побегов ($h \geq 5 \text{ mm}$) на эксплант.

Флоральные экспланты

Из стерильных бутонов с помощью скальпеля извлекали пестик с цветоножкой (флоральный эксплант) и помещали горизонтально на питательные среды.

Введение в культуру флоральных эксплантов *R. «Pohjola's daughter»*

Бутоны *R. «Pohjola's daughter»* изолировали от растений открытого грунта в начале мая перед началом цветения, затем стерилизовали и выделяли флоральные экспланты, которые помещали горизонтально на поверхность АМ, содержащей различные концентрации ТДЗ (1,0; 2,5 мкМ) в комбинации 73,8 мкМ 2-іР с 15,0 мкМ ИМК (см. табл. 7). Время культивирования составило 12 недель. Полученные конгломераты укороченных побегов переносили на АМ0 для преодоления морфо-анатомических аномалий. Подсчет числа побегов на эксплант проводили после 6 недель элонгации.

Введение в культуру флоральных эксплантов *R. dauricum*

Бутоны *R. dauricum* изолировали от тепличных растений в феврале, затем стерилизовали и выделяли флоральные экспланты, которые помещали горизонтально на поверхность АМ, содержащей различные концентрации ТДЗ (1,0–5,0 мкМ), а также комбинации ТДЗ (1,0–5,0 мкМ) с 73,8 мкМ 2-іР + 15,0 мкМ ИМК или 2,5 мкМ зеатина (см. табл. 7). Время культивирования составило 11 недель. Для элонгации полученные конгломераты укороченных побегов переносили на АМ0. Подсчет числа побегов на эксплант проводили после 6 недель элонгации.

Для оптимизации системы регенерации *R. dauricum* флоральные экспланты, изолированные из бутонов в феврале, предкультивировали на АМ, не содержащей регуляторы роста (АМ0), в течение 4 дней. После предкультивирования экспланты инокулировали на АМ, содержащую 2,5 мкМ зеатина в сочетании с ТДЗ в различных концентрациях (1,0–5,0 мкМ). Время культивирования на индукционной среде составило 8 недель. Для элонгации полученные конгломераты укороченных побегов переносили на АМ0. Подсчет числа побегов на эксплант проводили после 6 недель элонгации.

Введение в культуру флоральных эксплантов *R. sichotense*

Бутоны *R. sichotense* изолировали от тепличных растений в феврале, стерилизовали, затем извлекали флоральные экспланты, которые помещали горизонтально на поверхность АМ0 для предкультивирования в течение 4 дней. Затем экспланты переносили на АМ, содержащую либо только 1,0 мкМ ТДЗ, либо 1,0 мкМ ТДЗ в сочетании с 2,5 мкМ зеатина. Флоральные экспланты культивировали на протяжении 8 недель. Полученные регенеранты переносили на АМ0 для вытягивания. Подсчет числа побегов на эксплант проводили после 6 недель элонгации.

2.5. Укоренение и адаптация регенерантов

Регенеранты, полученные из различных типов эксплантов, укореняли в условиях *in vitro* или *ex vitro*. Для стимуляции ризогенеза использовали два подхода (рис. 8):

- непосредственное культивирование на АМ, дополненной 25,0 мкМ ИМК;
- 4-часовую импульсную обработку в растворе 148.0 мкМ ИМК.

После импульсной обработки регенеранты помещали для укоренения либо на АМ0 в условиях *in vitro*, либо высаживали *ex vitro* в смесь торфа (рН = 4,0–5,0) и песка (в соотношении 1:1) или помещали в гидропонную ус-

тановку (см. рис. 8). Использовали гидропонную установку, аналогичную системе «Минивит».

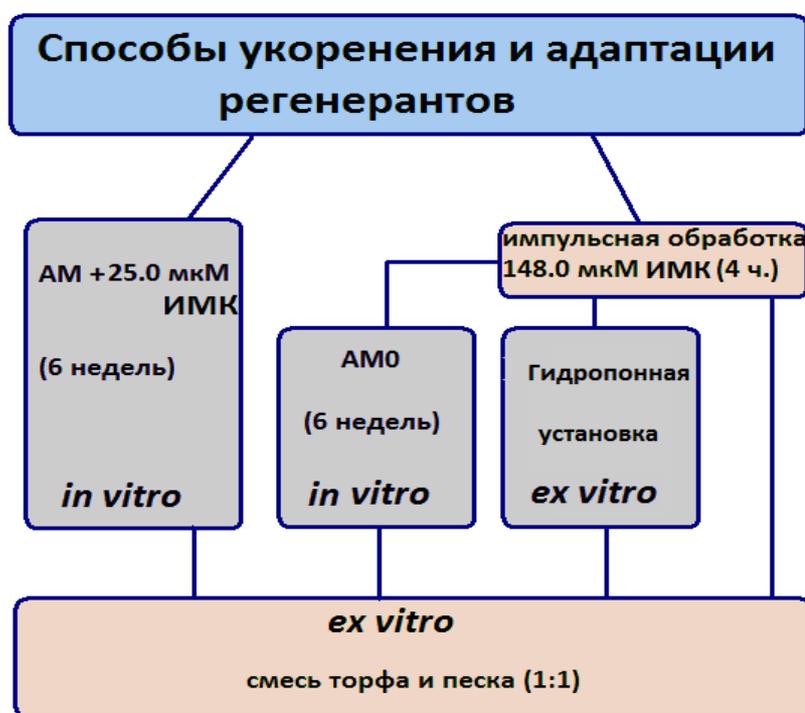


Рис. 8. Способы укоренения и адаптации микроклонов исследуемых видов и сортов рода *Rhododendron*.

Питательный раствор для гидропонной установки готовили на основе АМ, уменьшив в два раза концентрацию микро- и макроэлементов и исключив все органические компоненты (сахарозу, витамины и др.). Для интенсивного корнеобразования и адаптации в гидропонной установке использовали двухстадийную методику, предложенную Н.А. Вечерниной (Вечернина и др., 2008). Кювету гидропоники заполняли по очереди двумя растворами: № 1 – раствор с повышенным содержанием фосфатов и № 2 – раствор с повышенным нитрата аммония (табл. 8).

Адаптацию укорененных растений проводили в смеси торфа и песка (1:1) в течение 6 недель под пленкой, в условиях повышенной влажности. Растения содержали под освещением люминесцентных ламп с интенсивностью освещения $27 \text{ мкМоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ при 16-часовом фотопериоде и $23 \pm 2^\circ\text{C}$.

Адаптированные растения пересаживали в горшки 10 см в диаметре с почвенной смесью для азалий («Сад Чудес», Россия) и переносили в теплицу.

Таблица 8

**Состав питательного раствора для укоренения и адаптации регенерантов
в гидропонной установке**

Компоненты питательного раствора	Раствор №1, концентрация, мг/л	Раствор №2, концентрация, мг/л
NH ₄ NO ₃	200,000	400,000
KNO ₃	240,000	240,000
MgSO ₄ *7H ₂ O	185,000	185,000
CaCl ₂ *2H ₂ O	220,000	220,000
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	380,000	190,000
Sequestren 138	50,000	50,000
MnSO ₄ *H ₂ O	8,450	8,450
ZnSO ₄ *7H ₂ O	4,300	4,300
H ₃ BO ₃	3,100	3,100
KI	0.150	0.150
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,013	0,013
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,013	0,013
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,125	0,125

2.6. Морфогистологический анализ процессов регенерации *in vitro*

Исследование морфологии полученных регенерантов проводили с помощью стереомикроскопа Carl Zeiss Stereo Discovery V 12 программой AxioVision 4.8 для получения, обработки и анализа изображений (Carl Zeiss, Germany). Путь морфогенеза и локализацию его начальных этапов в тканях экспланта определяли с помощью гистологического анализа.

Листовые экспланты, культивировавшиеся на АМ с добавлением 1,0 мкМ ТДЗ, фиксировали на 0, 10, 14, 21, 35-й день и через 8 недель после начала эксперимента для световой микроскопии.

Для фиксации материала использовали смесь ледяной уксусной кислоты (99,9 %), формалина (40 %) и этилового спирта (96 %) в пропорциях 7:7:100 соответственно (ФАА). Дегидратацию проводили в серии этиловых

спиртов от 70 до 96 %. Дегидратированный материал проводили через смеси хлороформа и спирта (1:2 и 2:1) и заливали в «Paraplast» (Sigma, USA). Срезы толщиной 7 мкм, полученные на ротационном микротоме Microm HV-325 (Thermo Scientific, Германия), окрашивали гематоксилином по Эрлиху в течение 15 мин и затем 1 % анилиновым синим в течение 3 мин (Паушева, 1988). Окрашенные срезы заклевали мовиолом.

Гистологический анализ проводили с помощью микроскопов AxioPlan 2 imaging и Axioskop-40 (Carl Zeiss, Germany), фотосъемку – камерой AxioCam MRc5 с использованием программы AxioVision 4.8 для получения, обработки и анализа изображений.

2.7. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку и анализ полученных данных проводили с помощью компьютерных программ Microsoft Excel 7.0 и Statistica 8.0. Данные представлены в виде средних значений и стандартных ошибок ($M \pm m$). Для сравнения средних значений независимых выборок использовали многокритериальный тест Дункана (однофакторный дисперсионный анализ).

ГЛАВА 3. МОРФОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ СЕМЯН НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *RHODODENDRON* В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

При введении в культуру и микроклональном размножении дикорастущих видов и особенно редких видов в качестве исходного материала предпочтительно использовать семена. Семена собирают из возможно большего количества природных популяций, поскольку, таким образом, обеспечивается генетическое разнообразие вида и сохранение его в коллекциях *in vitro* (Benson et al., 2000). Кроме того, использование проростков в качестве эксплантов позволяет получить широкий спектр морфогенных реакций, поскольку проростки обладают высоким регенерационным потенциалом. Высокая морфогенная активность проростков может быть связана со структурной и физиологической целостностью этого экспланта (Malik, Saxena, 1992).

Для достижения высоких показателей всхожести при работе с семенами следует учитывать условия их прорастания. Для большинства представителей рода *Rhododendron* характерно поверхностное прорастание семян. Следовательно, важным фактором для их прорастания является достаточная освещенность. Ключевая роль освещенности при прорастании семян рододендронов показана в работах многих авторов (Кондратович, 1981; Александрова, 2007; Кокшеева, 2009). Немаловажным фактором для прорастания семян рододендронов является температурный режим. Для активного прорастания семян представителей рода *Rhododendron* необходима температура воздуха в пределах 18–22°C (Центалович, 1984; Петухова, 2006).

Для некоторых видов и сортов рододендронов зарубежной селекции разработаны эффективные протоколы микроразмножения (Eeckhaut et al., 2010). В основе создания таких технологий лежит детальное изучение особенностей морфогенеза и регенерации побегов из различных типов эксплантов. Традиционно для получения микроклонов в культуре *in vitro* используют питательную среду по прописи Андерсена (AM), дополненную 73,8 мкМ 2-изопентиниладенина (2-iP) и 22,8 мкМ индолил-3-уксусной кислоты (ИУК)

(Anderson, 1984). Наряду с 2-иР, в качестве регуляторов роста с цитокининовой активностью для микроразмножения рододендронов используют зеатин, а в последние годы и ТДЗ, который является мощным индуктором морфогенных реакций у древесных в культуре *in vitro* (Kamenicka et al., 1998; Huettelman, Preece, 1993). Представленное исследование нацелено на выявление морфогенных реакций проростков *R. dauricum* и *R. schlippenbachii* на различные регуляторы роста в культуре *in vitro* и создание протоколов регенерации этих перспективных видов.

3.1. Прораствание семян

Прораствание *R. dauricum* и *R. schlippenbachii* наблюдали через 4-6 дней после инокуляции. Формирование проростков из семян исследуемых видов отмечено после 10 дней культивирования, причем все проростки имели нормальное строение и окраску (рис. 9).

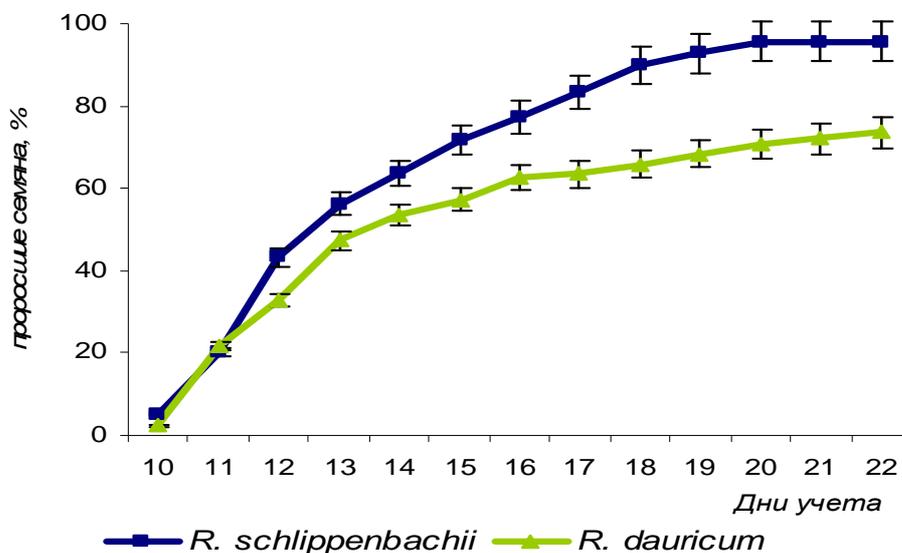


Рис. 9. Динамика всхожести семян *R. dauricum* и *R. schlippenbachii* (данные приведены в виде $M \pm m$)

Длительность прораствания семян составила 22 дня. Массовая всхожесть семян *R. dauricum* наблюдалась на 11-й день, а семян *R. schlippenbachii* на 12-й день и составила 18 и 26 % соответственно (рис. 10). Общая всхожесть семян *R. schlippenbachii* была на уровне 96 %, энергия прораствания – 43 %. У семян

R. dauricum аналогичные показатели ниже: всхожесть – 74 %, энергия прорастания – 32 % (см. рис. 9). Полученные нами показатели всхожести семян изучаемых видов выше, чем полученные другими исследователями в нестерильных условиях (Кокшеева, 2009).

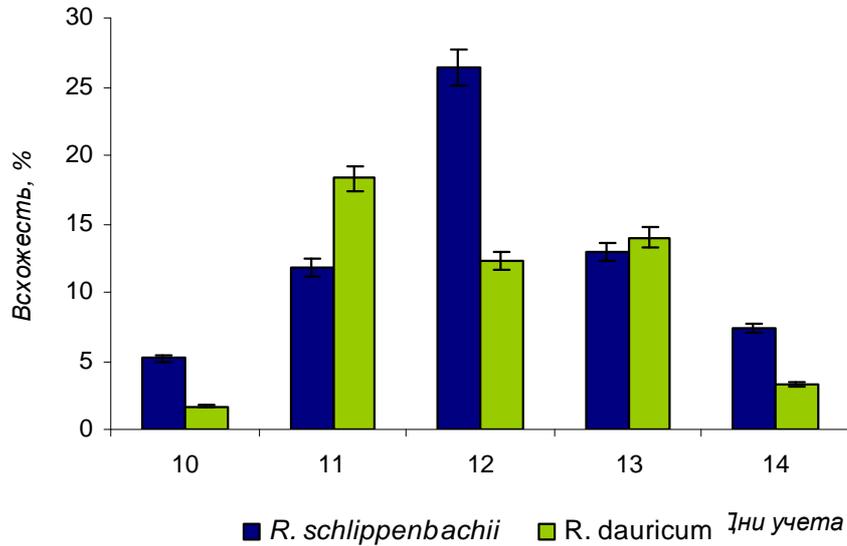


Рис. 10. Динамика прорастания семян *R. dauricum* и *R. schlippenbachii* по дням (данные приведены в виде $M \pm m$)

По полученным нами данным семена *R. dauricum* и *R. schlippenbachii* сразу проросли при освещенности $40 \text{ мкМоль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ и фотопериоде 16/8, без дополнительной обработки (Зайцева, Новикова, 2014), хотя в ряде исследований для улучшения всхожести семян рододендронов используют предобработки регуляторами роста, в том числе гибберелловой кислотой (Singh et al., 2010), бензиламинопурином и НУК (Cantos et al., 2007). Следовательно, для семян исследуемых видов характерен неглубокий физиологический тип эндогенного покоя (тип B_1), согласно классификации М.Г. Николаевой (Николаева, 1985). Неглубокий покой и высокие показатели всхожести семян *R. dauricum* и *R. schlippenbachii* позволяют в короткие сроки получить экспланты для введения в культуру *in vitro*. Справедливость этого вывода также показана при исследовании всхожести семян *R. ponticum* в условиях *in vitro* (Cantos et al., 2007).

3.2. Особенности регенерации побегов под действием различных регуляторов роста

Проростки с удаленными корешками инокулировали на среды, содержащие различные регуляторы роста (см. табл. 7).

Уровень регенерации эксплантов *R. schlippenbachii* под действием зеатина оказался выше, чем у эксплантов *R. dauricum*. На среде, дополненной 1,0 мкМ зеатина, 80 % эксплантов *R. dauricum* проявили морфогенную активность, при этом из них у 25 % эксплантов отмечена закладка адвентивных почек, которые дифференцировались из тканей гипокотилия проростков (рис. 11, 12, а). В ходе исследования различных концентраций зеатина наибольший 100 %-ный уровень регенерации *R. schlippenbachii* получен в присутствии 2,5 мкМ этого цитокинина, причем из них у 20% проростков сформировались адвентивные почки (рис. 12, б). Однако, превышение оптимальных концентраций зеатина в индукционной среде приводило к снижению доли эксплантов, способных к морфогенному ответу. При этом сократилась и частота образования адвентивных почек и у *R. dauricum*, и у *R. schlippenbachii*.

Экспланты *R. dauricum* и *R. schlippenbachii*, культивировавшиеся на питательных средах, содержащих 1,0 мкМ ТДЗ, дали 100 %-ный морфогенный ответ. Присутствие ТДЗ в среде не только эффективно снимало апикальное доминирование, но и вызывало адвентивное побегообразование на гипокотиле у 50 % эксплантов *R. dauricum* (Зайцева, Новикова, 2014) и у 90 % *R. schlippenbachii* (рис. 12, а, б). Эффект ТДЗ на адвентивное побегообразование был существенно выше, чем индукция этого процесса низкими концентрациями зеатина. (см. рис. 12, а, б).

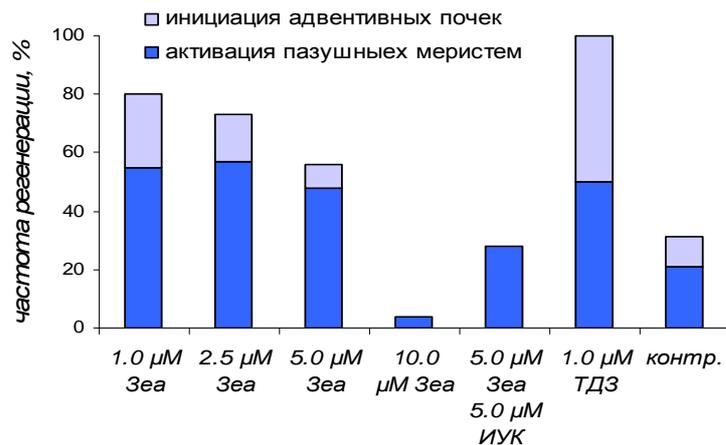
Таким образом, при оптимизации стадии собственно размножения с использованием проростков *R. dauricum* и *R. schlippenbachii* установлено, что зеатин и ТДЗ индуцируют как активацию пазушных меристем проростков, так и адвентивное побегообразование (см. рис. 11). Отмечено, что регенерационная способность проростков исследуемых видов различается и имеет видоспецифичный ха-

рактир. Полученные данные свидетельствуют о том, что ТДЗ не только эффективно снимает апикальное доминирование, но и является эффективным триггером для дедифференциации клеток и приобретению компетенции к дальнейшему морфогенезу. Полученные таким образом адвентивные почки имеют значительно больший потенциал для размножения, чем активация пазушных меристем.

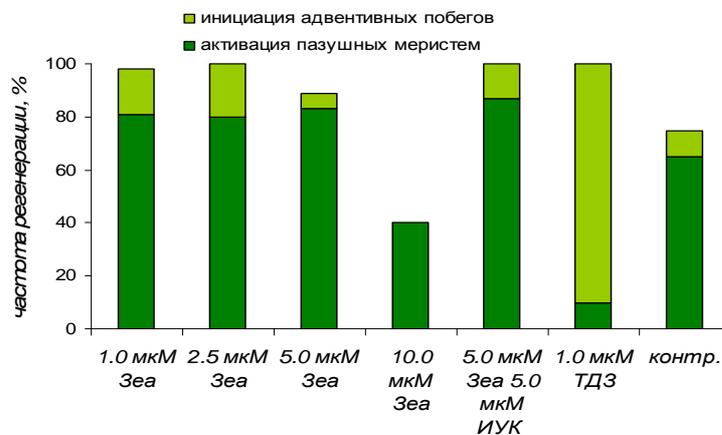


Рис. 11. Регенерация адвентивных и пазушных почек *R. dauricum* под действием ТДЗ.

Условные обозначения: *ап* – адвентивные побеги, *гк* – гипокотиль, *пп* – пазушные побеги, *см* – семядоли



а



б

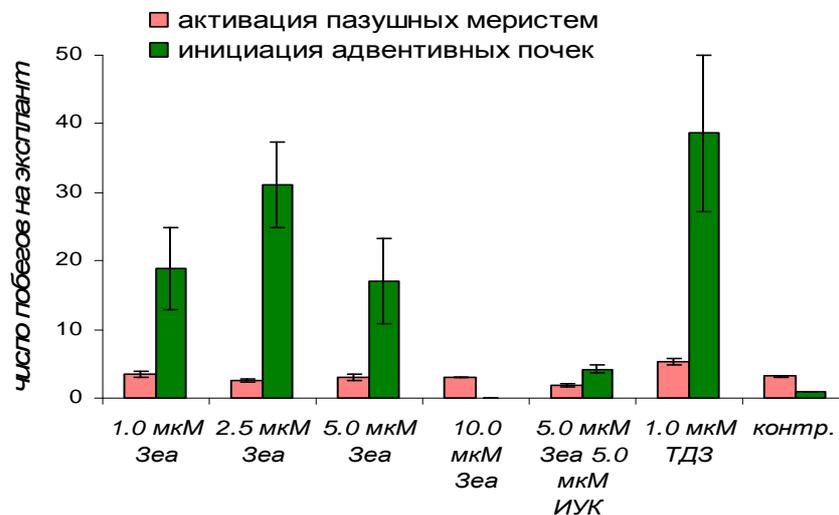
Рис. 12. Частота регенерации побегов *R. dauricum* (а) и *R. schlippenbachii* (б) в зависимости от типа и концентрации регуляторов роста

Использование проростков в качестве эксплантов позволяет оценить их морфогенный ответ на различные регуляторы роста *in vitro*. В работах М. Кантос с соавторами отмена возможность образования одновременно побегов и каллуса из проростков *R. ponticum*, культивированных на среде содержащей БАП и НУК (Cantos et al., 2007). При индукции морфогенеза из разных изолированных частей проростков *R. smirnowii*, *R. catawbiense* и некоторых других, на среде АМ, содержащей 73,8 мкМ 2-іР и 22,8 мкМ ИУК, показано, что наибольшим регенерационным потенциалом обладает апекс проростка, а регенерационный потенциал других частей проростков, в частности гипокотиля, низок (Кутас, 2009). В таком случае регенерация достигалась за счет снятия апикального доминирования и активации пазушных меристем. В нашем исследовании, используя проростки *R. dauricum* в качестве эксплантов, и, заменив традиционно используемый для размножения рододендронов цитокинин 2-іР на зеатин или ТДЗ, мы наблюдали прямую регенерацию побегов, которая происходила за счет активации пазушных меристем проростка и закладки множества адвентивных почек непосредственно на гипокотиле эксплантов. При этом отмечено, что частота регенерации побегов на гипокотиле выше при низких концентрациях зеатина и уменьшается при увеличении концентрации этого цитокинина в питательных средах. Эффект снятия апикального доминирования и закладка вторичных адвентивных почек сохраняется в последующем пассаже на АМ0.

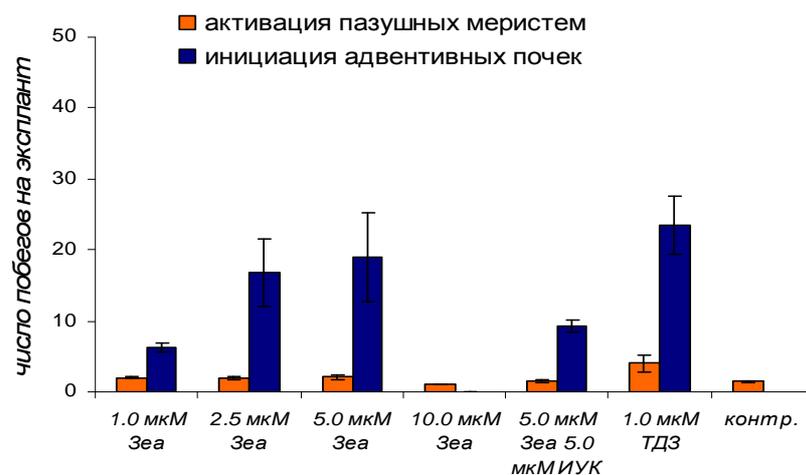
Подсчет числа побегов полученных за счет активации пазушных меристем возможен после 8 недель культивирования на индукционных средах, но число адвентивных побегов на эксплант удалось посчитать только после 6 недель элонгации на АМ0 (Зайцева, Новикова, 2014).

3.3. Элонгация побегов на безгормональных средах

Коэффициент размножения *R. dauricum* и *R. schlippenbachii* считали отдельно для пазушных и адвентивных побегов. Максимальное число как пазушных, так и адвентивных побегов на эксплант исследуемых видов получено под действием 1,0 мкМ ТДЗ. Для *R. dauricum* этот показатель составляет в среднем 5 пазушных и 40 адвентивных побегов на эксплант, для *R. schlippenbachii* 4 и 23 побегов, соответственно (рис. 13, а, б). Из испытанных концентраций зеатина наиболее эффективной для микроразмножения *R. dauricum* и *R. schlippenbachii* является 2,5 мкМ (рис. 13, а, б).



а



б

Рис. 13. Влияние регуляторов роста на интенсивность образования боковых и адвентивных побегов из проростков *R. dauricum* (а) и *R. schlippenbachii* (б). Данные представлены в виде $M \pm m$

Следует заметить, что под влиянием ТДЗ формируются укороченные побеги, которые требуют дополнительной элонгации. Конгломераты адвентивных побегов *R. dauricum* образованных *de novo* под действием ТДЗ и зеатина имели аномальное развитие: укороченные, витрифицированные побеги с удлиненными ланцетовидными листочками. Некоторые авторы отмечают необратимость этих изменений (Tomson et al., 2004). Однако, по нашим данным при культивировании таких конгломератов на среде для элонгации (АМ0) через 8 недель, регенеранты *R. dauricum* имели нормальное строение и были способны к дальнейшему укоренению и адаптации (рис. 14).



Рис. 14. Регенеранты *R. dauricum* полученные под действием ТДЗ до (а) и после (б) элонгации на АМ0 в течение 6 недель

Таким образом, разработан протокол клонального микроразмножения *R. dauricum* и *R. schlippenbachii* (приложение 1, 3). Показано, что семена перспективны в качестве источника эксплантов для введения в культуру *in vitro*, поскольку они имеют неглубокий тип покоя и высокую всхожесть. Для массового получения клонов *R. dauricum* и *R. schlippenbachii* рекомендуется ис-

пользовать среду АМ, дополненную 1,0 мкМ ТДЗ или 2,5 мкМ зеатина. При этом регенерация происходит как за счет активации пазушных меристем, так и посредством закладки адвентивных почек на гипокотиле. Культивирование полученных регенерантов на АМ0 способствует элонгации побегов и преодолению аномалий, возникших под действием ТДЗ.

Побеги полученные за счет активации пазушных меристем с большей вероятностью, чем адвентивные, повторяют генотип исходной формы. Разделение побегов на адвентивные и пазушные позволит использовать разработанную систему регенерации, как для сохранения исходных генотипов, так и, возможно, для селекционной работы с целью получения новых форм.

Использование семян в качестве исходного материала при клональном микроразмножении рододендронов целесообразно в качестве составной части различных программ по сохранению редких ценных генотипов, таких как *R. schlippenbachii* и *R. dauricum*. Подобные работы с использованием семян ведутся в Испании, где авторами показана высокая эффективность применения методов *in vitro* для сохранения реликтовых популяций *R. ponticum* (Cantos, 2007).

ГЛАВА 4. ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОБЕГОВ *DE NOVO* ИЗ ЛИСТОВЫХ ЭКСПЛАНТОВ

Разработка новых систем регенерации и оптимизация уже существующих, минуя стадию образования каллуса, необходима для воспроизводства ценных генотипов рододендронов. Культура изолированных листовых эксплантов представителей рода *Rhododendron* – перспективная система не только для массового размножения, но и для изучения фундаментальных основ морфогенеза в условиях *in vitro*, поскольку отсутствие апикальных меристем у листа дает возможности индуцировать широкий спектр морфогенных реакций клеток экспланта (Lo et al. 1997 a, b; Woo, Wetzstein, 2008). В работах некоторых авторов указано на низкую частоту регенерации из листовых эксплантов рододендронов (Fordham et al., 1982; Imel, Preece, 1988; Iapichino et al., 1991). Создание эффективных систем регенерации *in vitro* является важным шагом в массовом размножении и будущей трансформации с целью получения новых сортов.

Одним из наиболее эффективных триггеров морфогенеза, инициированного из тканей древесных растений, является тидиазурон (ТДЗ) – фенилзамещенное соединение мочевины (Huetteman, Preece, 1993; Murthy et al., 1998; Guo et al., 2011). Наиболее часто ТДЗ используют как компонент усиливающий действие традиционных регуляторов роста в культуре листовых эксплантов различных видов и сортов представителей рода *Rhododendron* (Iapichino et al., 1991, 1992; Mertens et al., 1996; Samyn et al., 2002; Pavingerova, 2009). Однако, поскольку высокая активность ТДЗ связана с его влиянием на уровень эндогенных регуляторов роста, прежде всего цитокининов и ауксинов (Murch, Saxena, 2001 a, b; Zhang, 2005), пролиферации побегов можно добиться, не используя дополнительные ростовые вещества.

Морфогенез, индуцированный ТДЗ, в культуре листовых эксплантов *in vitro* может проходить по прямому (Samyn et al., 2002; Tomsone, Gertnere, 2003) или по непрямому пути, через стадию каллусообразования (Pavingerova,

2009, Herbert et al., 2010). Более того в литературе встречаются данные об инициации соматического эмбриогенеза из листовых эксплантов *R. catawbiense* «Grandiflorum» (Vejsadová, Petrova, 2003). Учитывая эти данные, создание систем регенерации из листовых эксплантов представителей рода *Rhododendron* должно сопровождаться гистологическим анализом для уточнения путей морфогенеза.

В некоторых работах показан стимулирующий эффект ТДЗ в комбинации с традиционно используемыми для микроразмножения рододендронов регуляторами роста, такими как 2-иР и ИУК, на регенерацию побегов (Mertens et al., 1996; Preece et al., 1991 b, 1993; Thomson, 2004). Влияние этого индуктора на морфогенный потенциал листовых эксплантов *R. catawbiense* «Grandiflorum» отчасти изучен (Tomson, Gertner, 2003; Pavingerova, 2009), однако, по нашим данным, исследования в этой области с листовыми эксплантами *R. sichotense* не проводились.

Цели представленного исследования в культуре *in vitro* *R. catawbiense* «Grandiflorum» и *R. sichotense*: (1) проанализировать эффект различных концентраций и типов обработки, включая импульсную обработку, на регенерационный потенциал листовых эксплантов; (2) выявить морфогенный ответ различных генотипов в полученных системах *in vitro*, используя гистологический анализ.

4.1. Влияние различных концентраций и способов обработки тидиазурином на регенерацию побегов *R. catawbiense* «Grandiflorum» и *R. sichotense*

Формирование выпячиваний наблюдали на поверхности листовых эксплантов *R. sichotense* после 14 дней культивирования на средах, содержащей 0,1, 0,5 и 1,0 мкМ ТДЗ. Регенерация происходила на адаксиальной стороне листовых эксплантов в области черешка или основания листовой пластины (рис. 15, а). Отмечено, что число выпячиваний в этой зоне увеличивалось на протяжении всего культивирования (рис. 15, б). Однако, конгломераты адвентивных почек сфор-

мировались только после 8 недель в культуре. Сформированные конгломераты побегов наблюдали к 15 неделе культивирования (рис. 15, в).

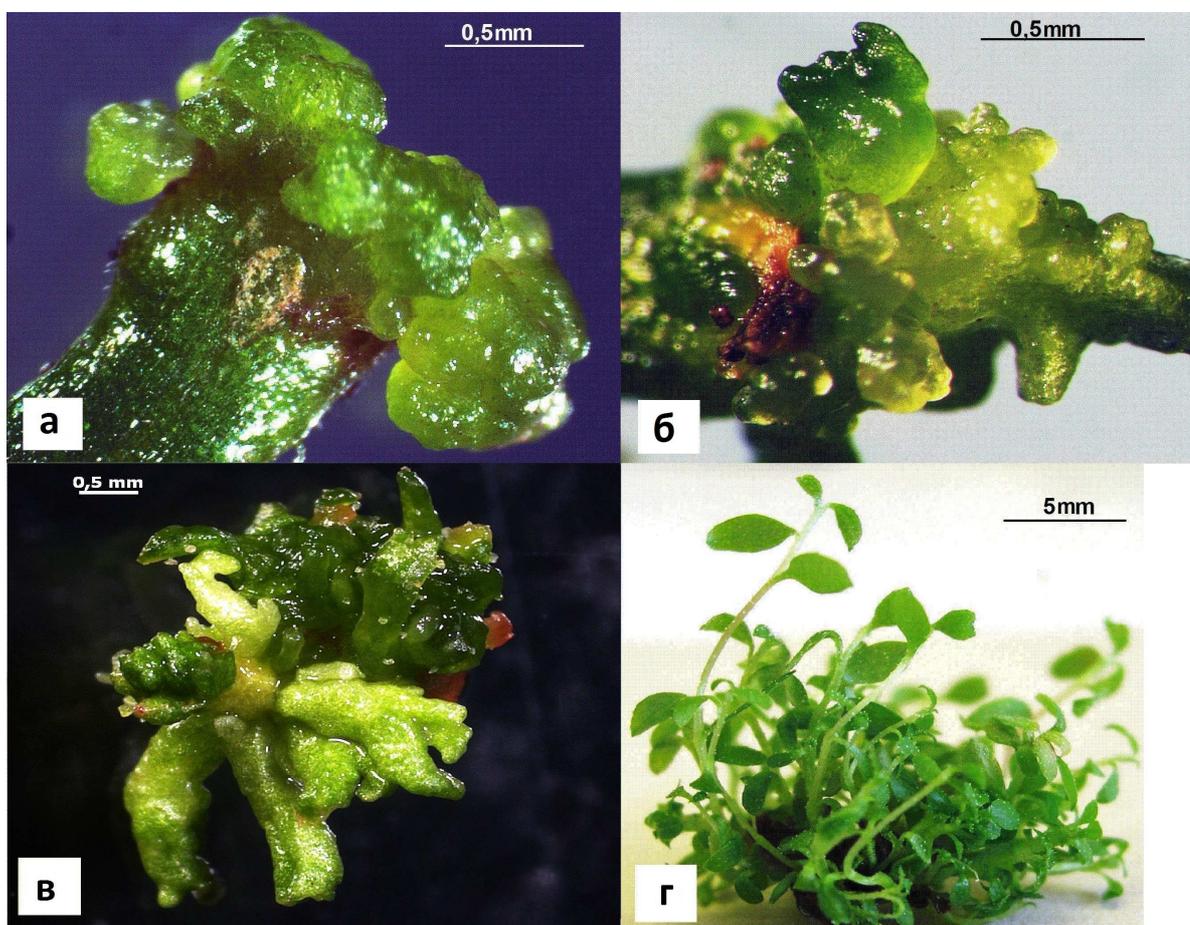


Рис. 15. Влияние ТДЗ (1,0 мкМ) на морфогенез побегов в культуре листовых эксплантов *R. sichotense*: а – формирование выпячиваний после 14 дней культивирования; б – развитие выпячиваний и формирование зачатков почек на 21 день культивирования; в – конгломерат видоизмененных укороченных побегов, сформировавшихся к 15-й неделе; г – конгломерат побегов после 8 недель элонгации на АМ0

Процесс регенерации из листовых эксплантов *R. sichotense* носил асинхронный характер, то есть в одном конгломерате одновременно можно было выделить как зачатки почек, находящиеся на ранних этапах развития, так и полностью сформировавшиеся хорошо дифференцированные побеги $h \geq 5$ мм. Мы попытались разделить полученные конгломераты в зависимости от преобладания почек или побеговых структур в их составе после 15 недель культивирования (табл. 9).

Частота регенерации эксплантов на АМ, дополненной 0,1 мкМ ТДЗ составила 73 %, однако, у 28 % из них побеги не сформировались. Максимальный процент конгломератов состоящих из побегов получен на среде, содержащей 1,0 мкМ ТДЗ. Увеличение концентрации ТДЗ до 5,0 мкМ вызвало снижение частоты регенерации и сопровождалось образованием каллуса (табл. 9). Культивирование листовых эксплантов на питательной среде, содержащей 10,0 мкМ ТДЗ, привело к тотальной летальности эксплантов. Импульсная обработка листовых эксплантов водным раствором 30,0 мкМ ТДЗ в течение 4 часов с последующим культивированием на АМ0 оказалась не эффективной и не вызвала инициацию побегообразования, большинство регенерантов погибли в результате некроза. Максимальный уровень регенерации побегов (93 %) *R. sichotense* получен при культивировании на АМ, содержащей 1,0 мкМ ТДЗ (табл. 9).

Таблица 9

Действие ТДЗ на частоту регенерации и степень развития побегов из листовых эксплантов *R. sichotense* и *R. catawbiense* «Grandiflorum» после 15 недель культивирования

Концентрация ТДЗ, мкМ	<i>R. catawbiense</i> «Grandiflorum»			<i>R. sichotense</i>		
	Общая регенерация, %	Конгломераты почек без побегов, %	Конгломераты, почек с побегами, %	Общая регенерация, %	Конгломераты почек без побегов, %	Конгломераты, почек с побегами, %
0.1	35	0	35	73	28	45
0.5	60	0	60	75	9	66
1.0	85	0	85	93	23	70
5.0	47	47	0	15*	0	0
10.0	-	-	-	0	0	0
Импульсная обработка 30.0 (4 часа)	89	0	89	6	6	0

Примечание. * – регенерация каллуса.

Стереомикроскопические наблюдения процессов регенерации из листовых эксплантов *R. catawbiense* «Grandiflorum» показали, что через 10–12 дней после импульсной обработки раствором 30,0 мкМ ТДЗ с последующим пере-

носом на АМ0, а также при непосредственном культивировании на АМ, дополненной 0,1; 0,5 или 1,0 мкМ ТДЗ, нижняя часть черешка эксплантов приобретала красный цвет. Через 4 недели в этой области дифференцировались почки, которые давали начало видоизмененным укороченным побегам (рис. 16, а, б). Возникновение новых почек и интенсивное развитие побегов *de novo* привело к формированию шарообразных конгломератов укороченных побегов на черешке и основании листа (рис. 16, д).

Увеличение концентрации ТДЗ до 5,0 мкМ привело к уменьшению частоты регенерации, появление первого морфогенного ответа наблюдали только после 28–35 дней в культуре. Происходила прямая регенерация эмбриоидоподобных структур по всей поверхности листовой пластины на адаксиальной стороне (рис. 16, в). Через 15 недель культивирования регенеранты, полученные под действием 5,0 мкМ ТДЗ, представляли собой почки ($h \leq 2$ мм) на поверхности покоричневевшей листовой пластины экспланта. Развитие побегов не происходило (рис. 16, г). Конгломераты, полученные под действием 0,1–1,0 мкМ ТДЗ и импульсной обработки, напротив, состояли из видоизмененных укороченных побегов (см. рис. 16).

Максимальный процент регенерации получен после импульсной обработки 30,0 мкМ ТДЗ в течение 4 часов и при культивировании на АМ, содержащей 1,0 мкМ ТДЗ (89 и 85 %, соответственно). Присутствие 5,0 мкМ ТДЗ в питательной среде вызвало значительное снижение частоты регенерации из листовых эксплантов (47 %) (см. табл. 9).

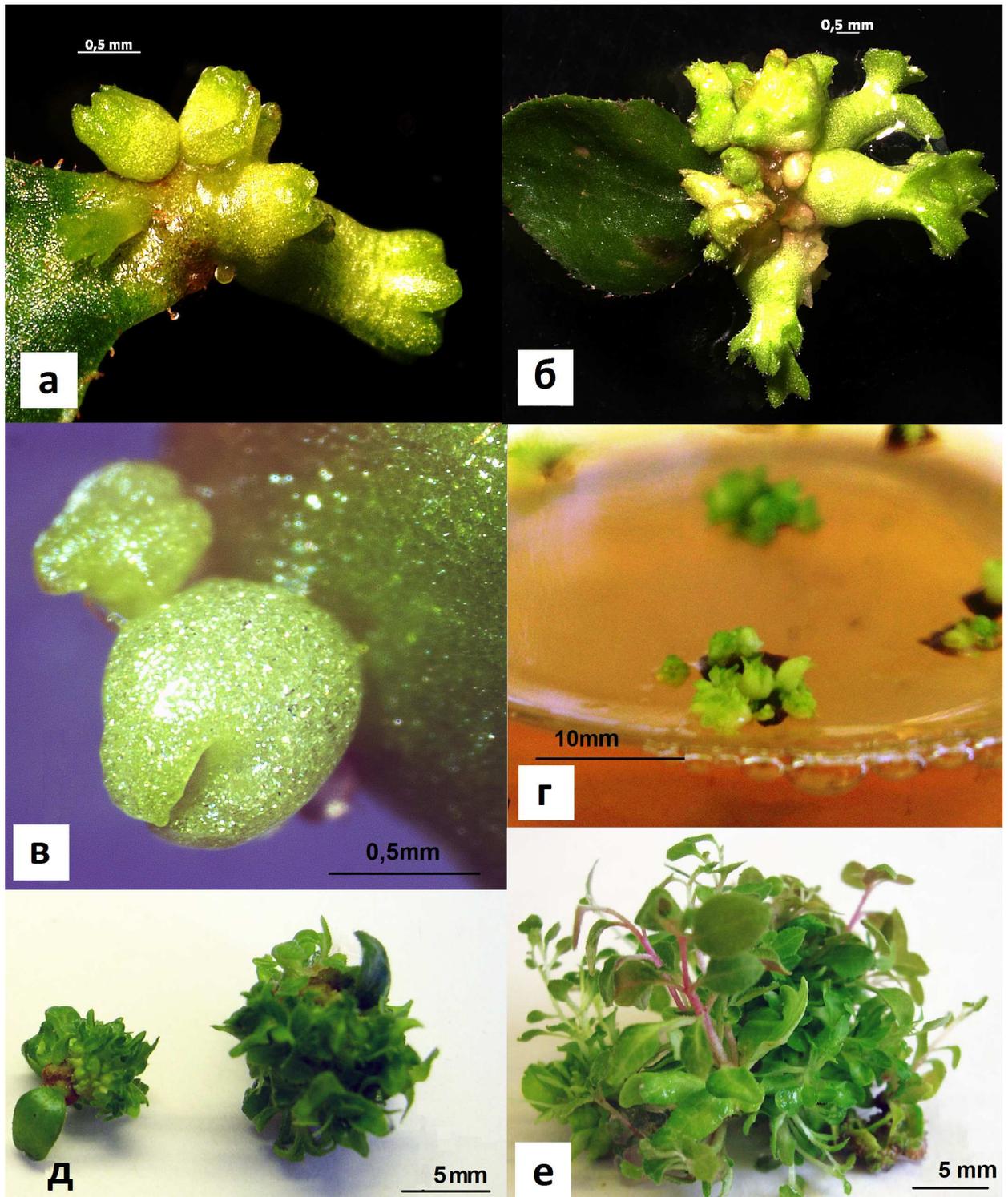


Рис. 16. Морфогенез в культуре листовых эксплантов *R. catawbiense* «Grandiflorum»: а – формирование почек и эмбриоидоподобных структур на 35-й день на среде 0,5 мкМ ТДЗ; б – формирование конгломерата укороченных побегов через 48 дней после импульсной обработки 30 мкМ ТДЗ; в – эмбриоидоподобные структуры, возникающие на среде 5,0 мкМ ТДЗ на 33-й день; г – конгломерат почек после 15 недель на среде 5,0 мкМ ТДЗ; д – конгломерат укороченных побегов после 15 недель культивирования на среде, дополненной 0,5 мкМ ТДЗ; е – конгломерат побегов после элонгации в течение 8 недель на АМ0

4.2. Особенности элонгации и развития побегов на безгормональных средах

Длительное культивирование листовых эксплантов *R. sichotense* и *R. catawbiense* «Grandiflorum» на средах, содержащих ТДЗ, способствовало развитию анатомических и морфологических нарушений в строении побегов *de novo*, для преодоления этих аномалий регенеранты перенесли на АМ0. В связи с этим число побегов на эксплант в культуре листовых эксплантов подсчитывали только после элонгации на АМ0 в течение 8 недель.

Число регенерированных побегов в конгломератах после элонгации, зависело от концентрации ТДЗ в регенерационной среде (табл. 10). Удлиненные побеги *R. sichotense* были получены только после культивирования на средах с низкими концентрациями ТДЗ (0,1–1,0 мкМ). Развитие побегов *de novo* не наблюдалось при более высокой концентрации ТДЗ в регенерационной среде, а также после использования короткой предобработки этим регулятором роста.

Таблица 10

Число побегов на эксплант, полученное под действием импульсной обработки и разных концентраций ТДЗ после элонгации на АМ0 в течение 8 недель

Концентрация ТДЗ, мкМ	<i>R. catawbiense</i> «Grandiflorum»	<i>R. sichotense</i>
0,1	8,2 ± 1,6 с	14,6 ± 2,3 b
0,5	36,0 ± 8,3 a	23,5 ± 3,8 a
1,0	25,0 ± 4,8 ab	24,6 ± 2,9 a
5,0	23,2 ± 2,1 abc	0
10,0	-	-
Импульсная обработка 30,0 (4 часа)	13,2 ± 1,9 bc	0

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm m$; значения, за которыми следуют одинаковые буквы, не имеют значимого отличия друг от друга в соответствии с тестом Дункана при $p = 0,05$.

Удлиненные побеги *R. catawbiense* «Grandiflorum» с нормальным строением (без аномалий) удалось получить как после использования импульсной обработки 30,0 мкМ ТДЗ, так и после культивирования на всех сре-

дах, содержащих ТДЗ (0,1; 0,5; 1,0 и 5,0 мкМ). Максимальное среднее число побегов на эксплант (36 шт.) получено после действия 0,5 мкМ ТДЗ (см. табл. 10). Отметим, что удлиненные регенеранты, полученные посредством импульсной обработки 30,0 мкМ ТДЗ, отличались большей высотой и имели более крупные листья.

После элонгации побеги *R. sichotense* и *R. catawbiense* «Grandiflorum» высотой более 5 мм отбирали для дальнейшего укоренения и адаптации (см. рис. 15, г; рис. 16, е).

Из испытанных концентраций ТДЗ присутствие 1,0 мкМ этого регулятора роста способствовало наиболее интенсивной индукции регенерационных процессов у листовых эксплантов *R. sichotense* (93%) и интенсивному побегообразованию после элонгации на безгормональной среде (24,6 побегов на эксплант). Установлено, что концентрации 0,5 и 1,0 мкМ ТДЗ являются оптимальными для регенерации побегов *R. catawbiense* «Grandiflorum» (60 и 85 %, соответственно) и микроразмножения (36 и 25 побегов на эксплант, соответственно). Увеличение концентрации ТДЗ до 5,0 мкМ и использование импульсной обработки с этим регулятором роста выявили более отчетливо генотипические различия в регенерационной способности исследуемых рододендронов. Регенерация побегов из листовых эксплантов *R. sichotense* не происходила в этих условиях, тогда как культивирование листовых эксплантов *R. catawbiense* «Grandiflorum» на АМ, содержащей 5,0 мкМ ТДЗ, позволило получить 23,2 побега на эксплант. Жидкая импульсная обработка этих эксплантов индуцировала довольно высокий процент регенерации (89%), в результате были получены удлиненные побеги без аномалий развития (13,2 побега на эксплант).

В нашем исследовании оптимизировано микроразмножение рододендронов из листовых эксплантов при использовании в качестве индуктора морфогенеза только ТДЗ. Ранее Г. Япичино с соавторами были разработаны протоколы для регенерации адвентивных побегов из листовых эксплантов для семи сортов рода *Rhododendron*, используя 2-іР и ИМК, однако, число регене-

рированных побегов в этих условиях оказалось низким (Iapichino et al., 1992). Использование ТДЗ в комбинации с ИУК для индукции регенерации из листовых эксплантов 15 сортов, включая *R. catawbiense* «Grandiflorum», оказалось более эффективно (Pavingerova, 2009). В указанных выше исследованиях показаны генотипические различия в регенерационном потенциале изученных рододендронов в ответ на гормональное воздействие, что соотносится с нашими исследованиями. В некоторых работах показана возможность инициации соматического эмбриогенеза из листовых эксплантов *R. catawbiense* «Grandiflorum» под действием ТДЗ и установлено, что воздействуя только ИМК и 2-иР без добавления ТДЗ, соматические эмбриониды не формируются (Vejsadova, 2003). Таким образом, показана ведущая роль ТДЗ в этом процессе, что прослеживается и в нашей работе.

Импульсная обработка испытана для минимизации негативного влияния на морфологию побегов длительной экспозиции ТДЗ, которая приводит к задержке роста побегов, витрификации, срастанию побегов и формированию эмбриоидоподобных структур (Ahmad, Anis, 2012). Такие побочные эффекты могут быть связаны с устойчивостью ТДЗ, как синтетического цитокинина к ферментативной деградации, таким образом, достигается стабильность этого соединения (Heutermann, Preece, 1993). Использование импульсной обработки позволяет сократить продолжительность воздействия регуляторов роста (Aasim et al., 2010). При этом длительность обработки может варьировать от нескольких часов до нескольких дней, когда регуляторы роста вносятся в индукционные среды (Pascual, Marin, 2005; Shaik et al., 2009; Graner et al., 2013). Хотя полученные нами данные по применению импульсной обработки в культуре листовых эксплантов *R. catawbiense* «Grandiflorum» показали невысокий уровень регенерации по сравнению с культивированием на АМ, содержащих 0,5 и 1,0 мкМ ТДЗ, этот метод имеет перспективы для оптимизации регенерационных систем *in vitro*, так как позволяет существенно сократить время культивирования.

Проблемы, связанные с развитием аномальных укороченных побегов

вследствие длительного воздействия ТДЗ, удалось успешно преодолеть при переносе регенерантов на безгормональную АМ. Эти результаты согласуются с мнением, что 2-стадийная процедура культивирования, включающая индукцию побегообразования ТДЗ и последующий перенос регенерантов на среды без регуляторов роста, предпочтительна для нормального органогенеза побегов (Guo et al., 2011).

Одним из удивительных свойств ТДЗ является способность одновременно стимулировать из клеток одного и того же экспланта и органогенез, и соматический эмбриогенез в зависимости от концентрации ТДЗ в питательной среде. Отмечено, что низкие концентрации ТДЗ (< 2,5 мкМ) стимулируют органогенез побегов, а высокие концентрации (5,0–10,0 мкМ) запускают процессы соматического эмбриогенеза из тканей листовых эксплантов *Saintpaulia ionantha* (Mithila et al., 2003). Схожие результаты получены у представителей *Pelargonium*, сортов *Rosa L. hybrid*, *Lens culinaris* при культивировании на средах, дополненных ТДЗ. Мы не выявили подобного эффекта различных концентраций ТДЗ на пути морфогенеза из листовых эксплантов рододендронов.

4.3. Гистологический анализ процессов морфогенеза в культуре листовых эксплантов

Исследованию гистологических изменений вызванных ТДЗ предшествовало изучение исходного строения листовых эксплантов *R. sichotense*. В ходе исследования с помощью световой микроскопии поперечных и продольных срезов эксплантов *R. sichotense* в области основания листовой пластины (0 дней) установлено наличие однослойного эпидермиса, сформированного клетками округлой формы, под которым находятся паренхимные ткани с большим межклеточным пространством. В толще мезофилла располагается проводящий пучок (рис. 17, а).

В эпидермальном слое листовых эксплантов *R. sichotense* на 10 день

происходят антиклинальные и периклинальные деления одной или группы клеток (рис. 17, б). Деления наблюдали только в эпидермисе черешка и основания листовой пластины. Дальнейшая пролиферация этих клеток приводит к образованию протуберанцев на 14 день (рис. 17, в). В верхних слоях протуберанцев формируются меристематические центры (МЦ), в толще выпячиваний начинают дифференцироваться клетки прокамбия (рис. 17, г). На 35-й день культивирования из группы делящихся клеток на поверхности выпячиваний начинают дифференцироваться почки, их дальнейшая дифференциация приводит к образованию полноценных почек с листовыми примордиями, проводящая система которых связана с проводящей системой экспланта (рис. 17, д).

Гистологический анализ подтверждает асинхронность процессов морфогенеза индуцированного ТДЗ, т. е. одновременно на листовом экспланте можно наблюдать структуры находящиеся на разных этапах развития: дедифференциацию клеток, развитие выпячиваний, начало дифференциации почек и хорошо сформированные почки. Полностью сформированные почки наблюдали на 8-й неделе эксперимента. У почек *de novo* отмечены аномалии строения и развития: формирование множества листовых примордиев, ранняя активация роста пазушных меристем и укорочение междоузлий (рис. 17, е).

Начальные этапы морфогенеза *R. catawbiense* «Grandiflorum» сходны с таковыми у *R. sichotense*. Однако, нами не отмечено развитие протуберанцев на поверхности эксплантов предшествующих формированию почек как у *R. sichotense*. Органогенез из листовых эксплантов *R. catawbiense* «Grandiflorum» проходит через регенерацию эмбриоидоподобных структур на адаксиальной стороне (рис. 18, а, б). Гистологические исследования подтверждают связь этих *de novo* структур с тканями исходного экспланта через проводящую систему. Наряду с закладкой и развитием апекса почки, корневые апексы не дифференцировались и формирование биполярной структуры у регенерантов *R. catawbiense* «Grandiflorum» не происходило (рис. 18, в, г).

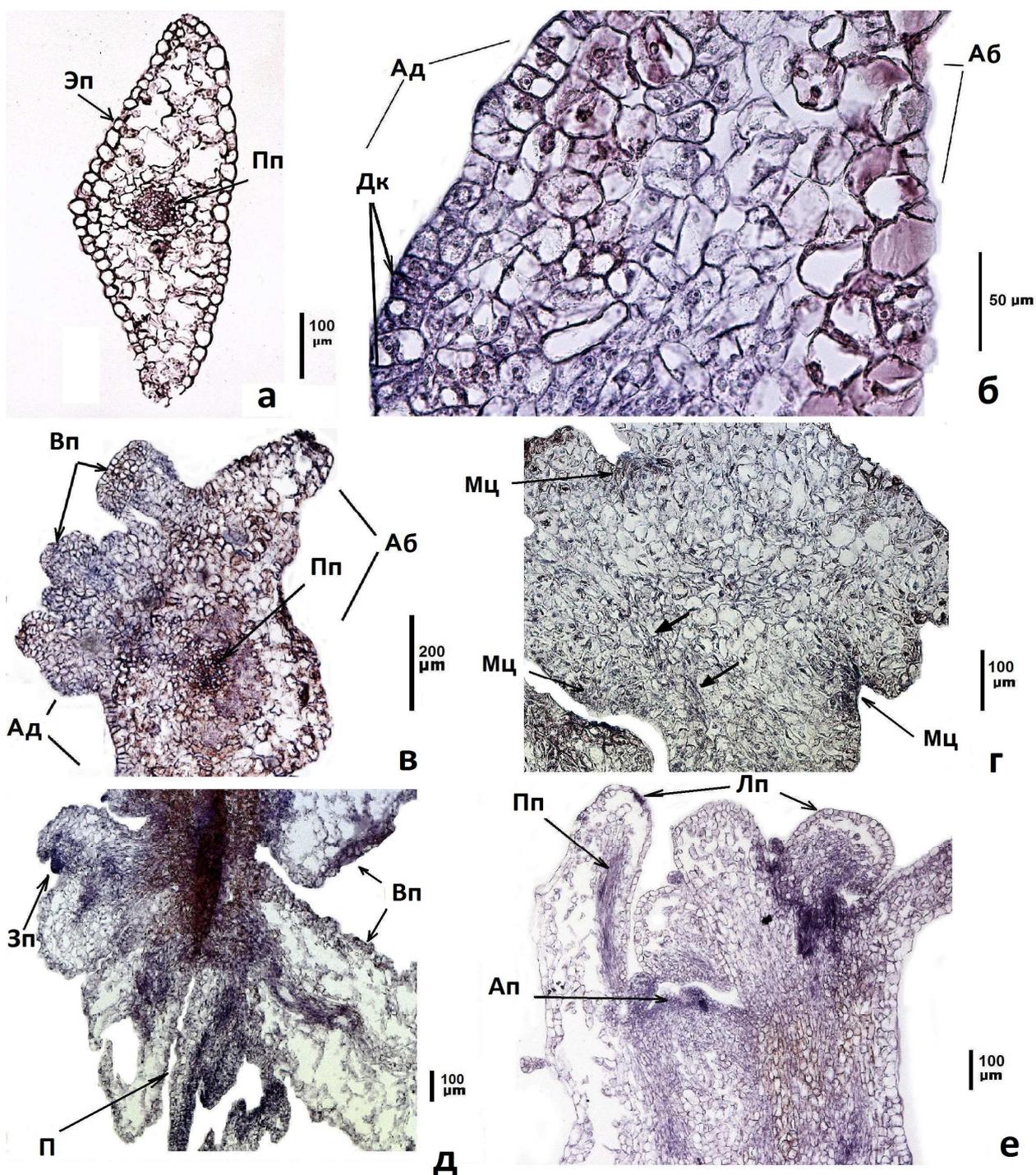


Рис. 17. Гистологический анализ формирования адвентивных почек из листовых эксплантов *R. sichotense* при культивировании на АМ, содержащей 1,0 мкМ ТДЗ: а) поперечные срез исходного экспланта (0 дней); б) продольные срез, первые клеточные деления эпидермиса на адаксиальной стороне листового экспланта (10 дней); в) образование выпячиваний на адаксиальной стороне листового экспланта, поперечный срез (14 дней); г) закладка меристематических центров на поверхности выпячиваний; д) продольный срез через дифференцирующуюся почку, закладка листовых примордиев (35 дней); е) формирование множества зачатков почек через 8 недель в культуре.

Условные обозначения: Аб – абаксиальная сторона, Ад – адаксиальная сторона, Ап – апекс почки, Вп – выпячивания (протуберанцы), Зп – закладка почки, Лп – листовые примордия, Мц – меристематический центр, П – почка, Пп – проводящий пучок

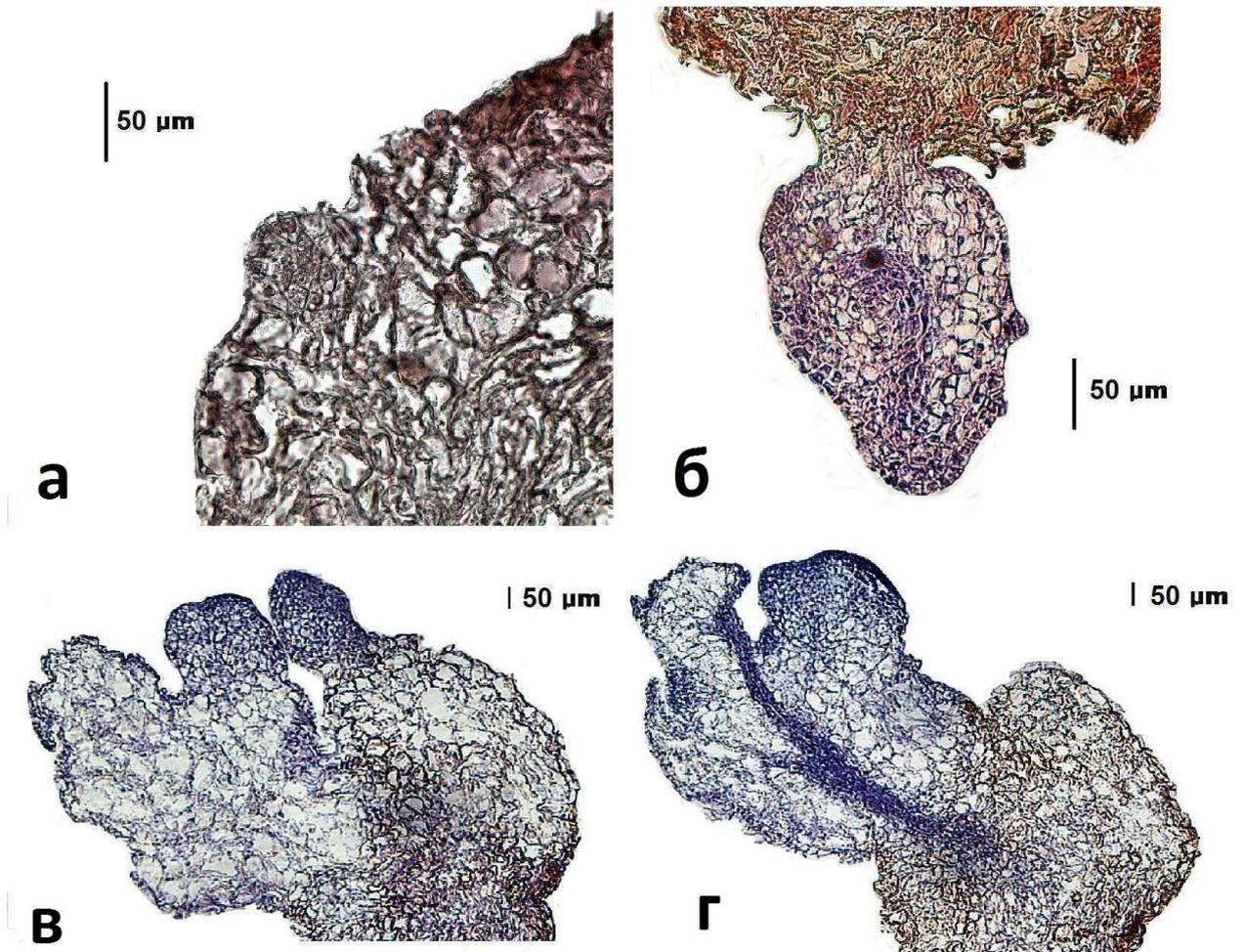


Рис. 18. Морфогенез в культуре листовых эксплантов *R. catawbiense* «Grandiflorum» под действием ТДЗ: а – начало дифференциации эмбриоидоподобных структур на среде, дополненной 0,5 мкМ ТДЗ (12 дней); б – развитие эмбриоидоподобной структуры на среде, дополненной 0,5 мкМ ТДЗ (35-й день); в – меристематическая эмбриоидоподобная структура на поверхности экспланта, находящегося на среде с 5,0 мкМ ТДЗ; г – почка, развившаяся под действием 5,0 мкМ ТДЗ

Таким образом, морфогистологические исследования способствовали детальному анализу различных путей регенерации исследованных генотипов. Адвентивные почки *R. sichotense* развивались из протуберанцев под действием 0,1–1,0 мкМ ТДЗ на адаксиальной стороне основания листа. Формирование протуберанцев в ходе прямого морфогенеза отмечено у многих видов растений: *Amaryllis belladonna* (Bruyn et al., 1992), *Cucumis melo* (Gaba et al., 1999), *Dioscorea alafa* (Varabokana et al., 2003), *Passiflora eduris* (Rocha et al., 2015) и др. Чаще всего развитие таких структур наблюдают при регенерации из немеристематических тканей экспланта (Gaba et al., 1999). Развитию про-

туберанцев предшествует дедифференцировка группы клеток, далее в верхних слоях образовавшихся протуберанцев происходит дифференцировка апексов (Banerjee et al., 1998; Gaba et al., 1999; Rocha et al., 2015). Также есть сведения, что из протуберанцев наряду с побегами формируются и листоподобные образования (Gaba et al., 1999).

Структуры, инициированные из листовых эксплантов *R. catawbiense* «Grandiflorum» под действием ТДЗ, напоминали соматические эмбриониды. Однако, при помощи гистологических исследований это предположение исключено, так как выявлена связь проводящих систем образований *de novo* и тканей экспланта, а также отсутствие корневых апексов. В работах зарубежных исследователей также отмечено развитие эмбриоидоподобных структур под действием ТДЗ. Подобный эффект ранее наблюдали в культуре листовых эксплантов *Elliottia racemosa* (*Ericaceae*) (Woo, Wetzstein, 2008 a), сахарного тростника (Wamaitha et al., 2010) и *Pelargonium × hortorum* (Madden et al., 2005).

ГЛАВА 5. РЕГЕНЕРАЦИЯ ПОБЕГОВ *DE NOVO* ИЗ ФЛОРАЛЬНЫХ ЭКСПЛАНТОВ

Высокая эффективность использования ТДЗ, установленная нами при регенерации побегов из листовых эксплантов *R. sichotense* и *R. catawbiense* «Grandiflorum», способствовала развитию дальнейших исследований по действию этого синтетического цитокинина на морфогенетический потенциал флоральных эксплантов таких полиморфных видов как *R. dauricum* и *R. sichotense*.

Цветение рододендронов продолжается в среднем 2–3 недели при этом зачастую у особей *R. dauricum* и *R. sichotense* отмечается неравномерное раскрытие цветочных почек, т.е. наряду с раскрывшимися цветками, на нижних побегах имеются закрытые генеративные почки (Петухова, 2006). Создание системы регенерации с использованием флоральных эксплантов позволяет проводить отбор форм с необходимой оригинальной окраской венчика в полевых условиях. Флоральные экспланты рододендронов имеют ряд преимуществ перед другими типами эксплантов, главными из которых являются низкий уровень контаминации и более продолжительный временной интервал для изоляции бутонов из условий *ex vitro* (Meyer, 1982; Dai et al., 1987; Rogany, Lineberger 1990). Более того, флоральные экспланты можно использовать для получения ценных генотипов рододендронов при помощи генетической трансформации (Piqueras et al., 2010).

Исследования регенерационного потенциала флоральных эксплантов рододендронов не многочисленны и в основном касаются вечнозеленых видов и сортов рододендронов. В 1982 г. М.М. Мейер предложил протокол микроразмножения с использованием изолированной завязи с цветоножкой для *R. catawbiense* (Meyer, 1982). Регенеранты были получены непрямым путем из изолированных завязей с цветоножкой под действием традиционно используемых для рододендронов регуляторов роста: 2-іР (73,8 мкМ) и ИУК (22,8 мкМ). Прямой органогенез в культуре флоральных эксплантов представителей рода *Rhododendron* показан при использовании ТДЗ (Murthy et al., 1998). При культивировании изолированных пыльников *R. «P.J.M. hybrids»* на

средах содержащих различные комбинации 2iP с ТДЗ были одновременно получены адвентивные побеги, флоральные структуры и каллус (Shevade, Preece, 1993; Huetteman, Preece, 1993). С. Томсон с соавторами (Tomsone, Gertnere, 2003; Tomsone et al., 2004) сообщали о прямой регенерации побегов непосредственно из тканей флоральных эксплантов *R. «Nova Zembla»* и «Irina» под действием ТДЗ (0,05–1,0 мг/л) в комбинации с 2-iP (15,0 мг/л) и ИМК (3,0 мг/л). Такие же результаты получены Д. Сикуранза и Н.А. Митковским (Sicuranza, Mitkowski, 2007) для *R. catawbiense* «English Roseum». Однако, в силу генотипических различий приемы микроразмножения, разработанные для вечнозеленых рододендронов, могут быть не эффективными в отношении дикорастущих листопадных или полувечнозеленых видов.

Представленное исследование нацелено на создание системы прямой регенерации побегов из флоральных эксплантов *R. dauricum* с использованием различных цитокининов и ТДЗ. Полученные результаты будут служить основой дальнейшей селекции *R. dauricum* и *R. sichotense* с целью получения морозостойких сортов с различной окраской венчика.

5.1. Введение в культуру флоральных эксплантов *R. «Pohjola's daughter»*

Морфогенный ответ флоральных эксплантов вечнозеленого морозоустойчивого сорта финской селекции *R. «Pohjola's Daughter»* был получен на АМ, содержащей традиционные для микроразмножения регуляторы роста (74 мкМ 2-iP и 15 мкМ IAA), дополненные 2,5 мкМ ТДЗ. Уже на 7-й день отмечали увеличение размеров цветоножки, в то время как рост завязи со столбиком прекратился. На 8 неделе культивирования у 50 % эксплантов наблюдали формирование выпячиваний (табл. 11). Появление структур в виде почек и укороченных розеточных побегов было отмечено на 12 неделе культивирования (рис. 19, а). Морфогенез побегов из флоральных эксплантов протекал асинхронно, поскольку одновременно происходило как развитие уже дифференцированных зачатков почек, так и формирование новых выпячиваний и почек.

Влияние концентрации ТДЗ на регенерационный потенциал флоральных эксплантов *R. «Pohjola's Daughter»*

Регуляторы роста растений, мкМ	Частота регенерации, %	Число побегов на эксплант, шт.	Высота побегов, мм
1,0 ТДЗ+73,8 2-іР+15,0 ИМК	0	-	-
2,5 ТДЗ+73,8 2-іР+15,0 ИМК	50	26,21 ± 5,26	1,2 ± 0,20

Снижение концентрации ТДЗ до 1,0 мкМ в комбинации других регуляторов роста оказалось неэффективным и привело к гибели эксплантов; регенерацию не наблюдали.

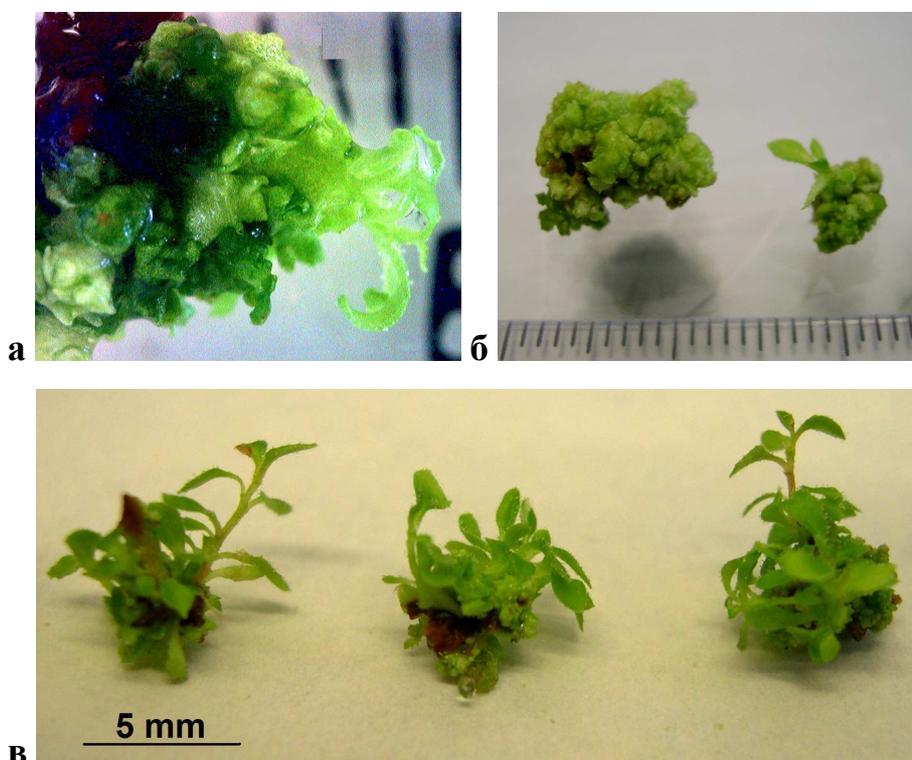


Рис. 19. Регенерация побегов *de novo* из флоральных эксплантов *R. «Pohjola's Daughter»*: а – почки и укороченные побеги на поверхности цветоножки, полученные при культивировании на АМ, содержащей 73,8 мкМ 2-іР, 15,0 мкМ ИМК и 2,5 мкМ ТДЗ; б – выпячивания, не развившиеся в побеги после элонгации; в – побеги, полученные после 6 недель элонгации на АМ0

После переноса эксплантов *R. «Pohjola's Daughter»* на среды для элонгации (АМ0) почки и укороченные побеги дали начало побегам *de novo* с нормальным строением (рис. 19, в). Число побегов на эксплант, полученное по-

сле элонгации составило 26,21 шт. (см. табл. 11). Однако, нами отмечено, что не все вновь образованные выпячивания способны формировать почки и полноценные побеги на средах для элонгации (рис. 19, б).

5.2. Система регенерации побегов из флоральных эксплантов *R. dauricum*

Культивирование флоральных эксплантов *R. dauricum* на АМ, содержащей 73,8 мкМ 2-іР и 15,0 мкМ ИМК в сочетании от 1,0 до 5,0 мкМ ТДЗ, не привело к регенерации побегов *de novo*, хотя экспланты пропорционально увеличивались в размерах, были покрыты железистыми волосками, сохраняли жизнеспособность и зеленый цвет в течение всего эксперимента, (табл. 12). Попытки стимулировать регенерацию побегов из флоральных эксплантов *R. dauricum* на средах, содержащей только ТДЗ в концентрациях от 1,0 до 5,0 мкМ также не дали результатов. Экспланты увеличивались в размерах и затем, либо подвергались некрозу, либо оставались жизнеспособными, но регенерации побегов не происходило. Дальнейшие эксперименты были направлены на поиск способов инициации процессов морфогенеза из флоральных эксплантов *R. dauricum* с помощью введения в состав сред дополнительного цитокинина – зеатина.

Таблица 12

Влияние различных регуляторов роста и предкультивирования на регенерационный потенциал флоральных эксплантов *R. dauricum*

Регуляторы роста растений, мкМ	Частота регенерации, %	
	без предкультивирования	с предкультивированием
1,0 ТДЗ	0	-
2,5 ТДЗ	0	-
5,0 ТДЗ	0	-
1,0 ТДЗ+73,8 2-іР+15,0 ИМК	0	-
2,5 ТДЗ+73,8 2-іР+15,0 ИМК	0	-
5,0 ТДЗ+73,8 2-іР+15,0 ИМК	0	-
1,0 ТДЗ+2,5 зеатина	45	87,5
2,5 ТДЗ+2,5 зеатина	10	12,5
5,0 ТДЗ+2,5 зеатина	0	0

Примечание. «-» – нет данных.

Флоральные экспланты, инокулированные на АМ, дополненную 1,0 мкМ ТДЗ в комбинации с 2,5 мкМ зеатина, увеличивались в размерах, затем через 3 недели культивирования происходило разрастание цветоножки эксплантов. Формирование почек на цветоножках наблюдали через 8 недель культивирования. Через 11 недель культивирования на АМ, содержащей 1,0 ТДЗ и 2,5 мкМ зеатина, отмечено формирование конгломератов адвентивных почек у 45 % флоральных эксплантов (см. табл. 12).

Экспланты, культивируемые на питательной среде с 2,5 мкМ ТДЗ и 2,5 мкМ зеатина, равномерно увеличивались в размерах (т.е. наблюдался рост одновременно всех частей экспланта). Однако, только у 10% эксплантов наблюдали появление морфогенного ответа после 11 недель в культуре. Наличие в среде 5,0 мкМ ТДЗ в сочетании с 2,5 мкМ зеатина вызвало увеличение размеров завязи, развитие железистых волосков на эпидермисе флоральных эксплантов, однако дальнейшего геммогенеза не наблюдали (см. табл. 12).

При переносе флоральных эксплантов на питательную среду АМ0 для элонгации, формирование нормальных побегов (в среднем 7 шт. на эксплант) наблюдали только у регенерантов, полученных под действием 1,0 мкМ ТДЗ и 2,5 мкМ зеатина (табл. 13).

Таблица 13

Влияние предкультивирования и индукции тидиазуром на формирование побегов *R. dauricum* после 6 недель элонгации на АМ0

Регуляторы роста растений, мкМ	Число побегов на эксплант, шт.		Высота побегов, мм	
	без предкультив.	с предкультив.	без предкультив.	с предкультив.
1,0 ТДЗ+2,5 зеатина	7,03 ± 1,02 а	7,33 ± 1,15 а	9,67 ± 0,47 а	10,33 ± 0,55 а
2,5 ТДЗ+2,5 зеатина	0	0	-	-
5,0 ТДЗ+2,5 зеатина	0	0	-	-

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm m$; значения, за которыми следуют одинаковые буквы, не имеют значимого отличия друг от друга в соответствии с тестом Дункана при $p = 0,05$.

Для повышения регенерационного потенциала флоральных эксплантов *R. dauricum* мы использовали предкультивирование на агаризованной АМ0 в

течение 4 дней, затем их помещали на индукционные среды, содержащие 2,5 мкМ зеатина в комбинации с ТДЗ в разных концентрациях.

Увеличение размеров цветоножки отмечено через 2 недели культивирования в присутствии 1,0 и 2,5 мкМ ТДЗ. Через 4 недели после начала эксперимента наблюдали появление морфогенного ответа на цветоножках флоральных эксплантов культивировавшихся на АМ, дополненной 1,0 мкМ ТДЗ и 2,5 мкМ зеатина (рис. 20, а). Развитие почек на цветоножках флоральных эксплантов происходило после 6 недель в культуре. Формирование конгломератов укороченных побегов отмечено у 87,5% флоральных эксплантов через 8 недель после начала эксперимента (см. табл. 12), что на 3 недели раньше, чем в эксперименте без предкультивирования на АМ0 (рис. 20, б).

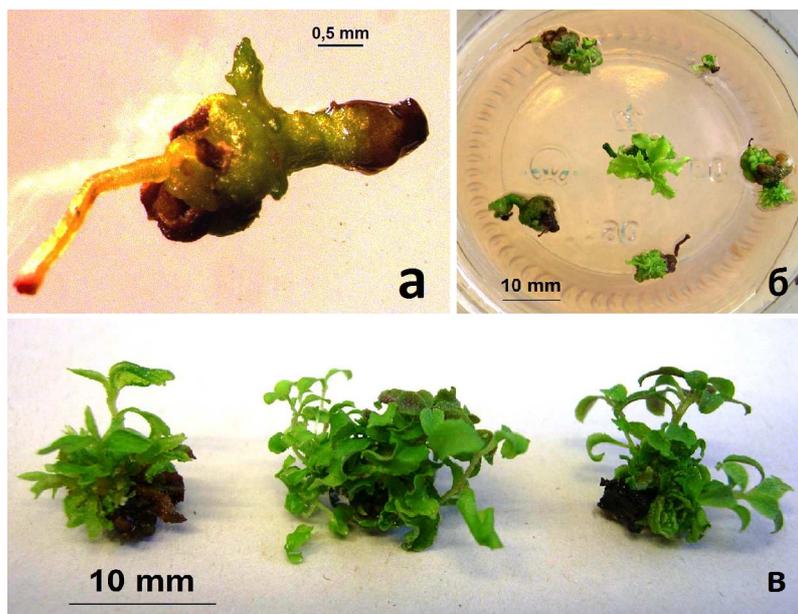


Рис. 20. Регенерация побегов *de novo* из флоральных эксплантов *R. dauricum* с предобработкой в течение 4 дней на АМ0 и последующем культивировании на АМ, содержащей 1,0 мкМ ТДЗ и 2,5 мкМ зеатина: а – начальные этапы морфогенеза побегов на цветоножке флоральных эксплантов через 4 недели культивирования; б – конгломераты укороченных побегов; в – побеги, полученные после 6 недель элонгации на АМ0

Повышение концентрации ТДЗ в питательной среде до 2,5 мкМ привело к значительному снижению уровня регенерации, в присутствии 5,0 мкМ ТДЗ регенерации не происходило.

Полученные конгломераты укороченных побегов переносили на АМО для элонгации. Однако, удлиненные побеги сформировали только те регенеранты, которые были получены под действием 1,0 мкМ ТДЗ и 2,5 мкМ зеатина (табл. 13, рис. 20, в). Данные табл. 13 свидетельствуют о незначительном влиянии предкультивирования на высоту и число побегов на эксплант.

5.3. Регенерация побегов из флоральных эксплантов *R. sichotense*

Поскольку *R. sichotense* и *R. dauricum* близкородственные виды, мы исходили из предположения о том, что концентрации и комбинации ТДЗ с зеатином, эффективные при индукции процессов регенерации из флоральных эксплантов *R. dauricum*, также будут эффективны и в отношении флоральных эксплантов *R. sichotense*.

Действительно, прием предкультивирования на безгормональной среде оказался эффективным и для флоральных эксплантов *R. sichotense*. Через 4 дня культивирования на АМО все части эксплантов пропорционально увеличились в размерах. Через 10 дней после переноса на питательные среды, содержащие 1,0 мкМ ТДЗ или 1,0 ТДЗ в сочетании с 2,5 мкМ зеатина, длина цветоножек эксплантов увеличилась. Появление морфогенных структур на цветоножке флоральных эксплантов отмечено через 3 недели культуры. Через 6 недель культивирования морфогенный ответ дали 100% флоральных эксплантов *R. sichotense*, вне зависимости от гормонального состава индукционных сред (табл. 14).

Таблица 14

Влияние ТДЗ и зеатина на регенерационный потенциал флоральных эксплантов *R. sichotense*

Регуляторы роста растений, мкМ	Частота регенерации, %	Число побегов на эксплант, шт.	Высота побегов, мм
1,0 ТДЗ	100	17,14 ± 3,53 а	10,57 ± 0,93 а
1,0 ТДЗ+2,5 зеатина	100	17,40 ± 3,07 а	7,70 ± 0,45 б

Примечание. Данные представлены в виде $M \pm m$; значения, за которыми следуют одинаковые буквы, не имеют значимого отличия друг от друга в соответствии с тестом Дункана при $p = 0,05$.

Регенеранты, инициированные в присутствии только ТДЗ и ТДЗ в сочетании с зеатином отличались по степени развития побега.

Так, регенеранты полученные под воздействием только ТДЗ представляли собой укороченные дифференцированные побеги и почки (рис. 21, б, справа), при сочетании ТДЗ с зеатином регенеранты представлены видоизмененными почками или зачатками почек (рис. 21, а, б, слева).

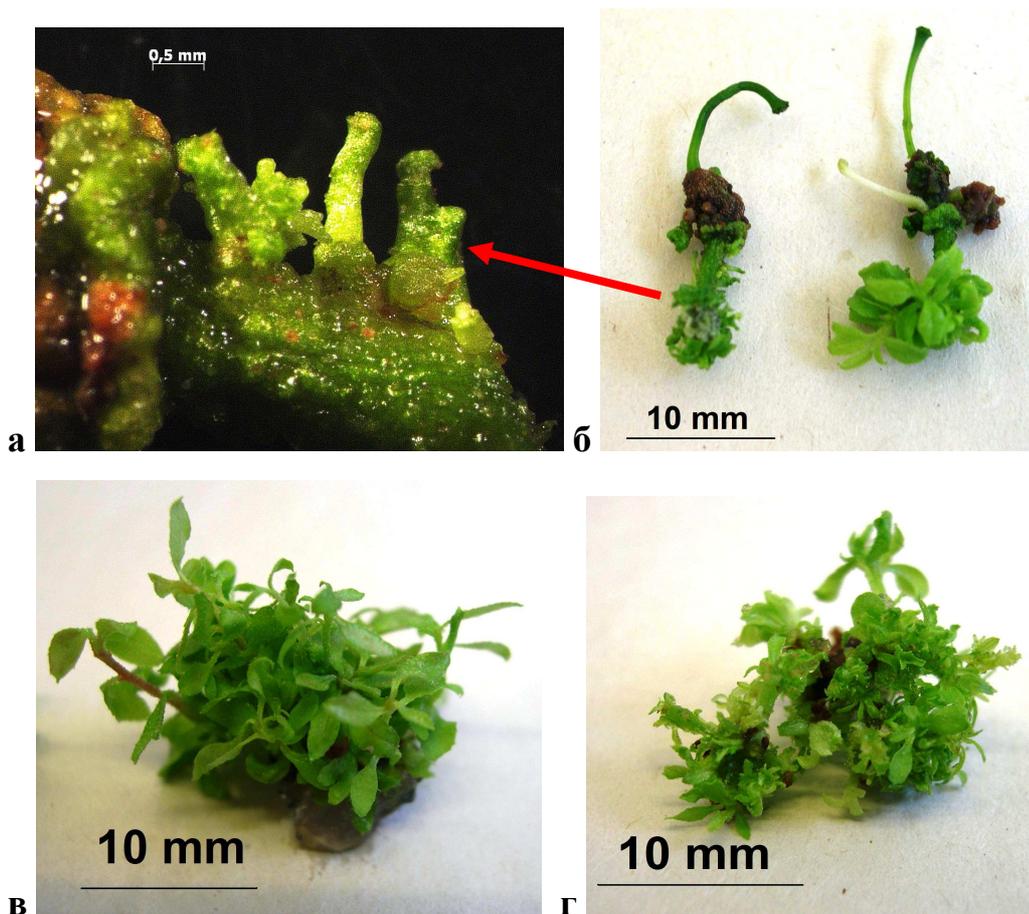


Рис. 21. Регенерация побегов *R. sichotense* из флоральных эксплантов: а – регенерация почек и выпячиваний под действием 1,0 мкМ ТДЗ и 2,5 мкМ зеатина; б – регенерация побегов под действием 1,0 мкМ ТДЗ и 2,5 мкМ зеатина (слева) и 1 мкМ ТДЗ (справа); в – *de novo* побеги, инициированные при помощи 1,0 мкМ ТДЗ, после элонгации; г – *de novo* побеги, инициированные при помощи 1,0 мкМ ТДЗ и 2,5 мкМ зеатина, после элонгации

Число побегов на эксплант после элонгации в течение 6 недель на АМ0 составило в среднем 17 шт. и существенно не зависело от комбинаций регуляторов роста в испытанных вариантах сред (см. табл. 14). Однако, от-

мечены различия в морфологии вновь образованных побегов (рис. 21, в, г). Конгломераты побегов, морфогенез которых был индуцирован под действием 1,0 мкМ ТДЗ в сочетании с 2,5 мкМ зеатина, состояли из большего числа укороченных витрифицированных побегов, для которых необходима дополнительная элонгация. Средняя длина побегов в таких конгломератах была меньше, чем у побегов, полученных на фоне только 1,0 мкМ ТДЗ (см. табл. 14).

Таким образом, при использовании системы регенерации из флоральных эксплантов, разработанной С. Томсон с соавторами (Tomson, Gertner, 2003) для вечнозеленых видов рододендронов, и основанной на действии ТДЗ в сочетании с 2-иР и ИМК, мы получили регенеранты только из флоральных эксплантов вечнозеленого сорта *R. «Pohjola's Daughter»*. Используя этот протокол, нам не удалось получить морфогенный ответ у *R. dauricum*, что, возможно, связано с генотипическими различиями этих групп рододендронов.

В нашем исследовании представлен новый двухступенчатый способ прямой регенерации побегов из флоральных эксплантов *R. dauricum*: (1) предкультивирование в течение 4 дней на АМ0, (2) индукция морфогенеза при помощи 1,0 мкМ ТДЗ и 2,5 мкМ зеатина с последующей элонгацией побегов на АМ0. Использование 2,5 мкМ зеатина в сочетании с 1,0 мкМ ТДЗ привело к прямой регенерации побегов на цветоножке флоральных эксплантов *R. dauricum*. По данным ряда исследователей зеатин по сравнению с 2-иР обладает большей активностью в отношении пролиферации побегов у рододендронов (Fordham et al., 1982; Hsia, Korban, 1997) и имеет синергический эффект с ТДЗ (Wondyifraw, Wannakraij, 2006). Однако, в нашем исследовании, с увеличением концентрации ТДЗ в питательной среде существенно снижалась регенерационная способность флоральных эксплантов, что позволяет говорить о ключевой роли ТДЗ в этом процессе. Морфогенный потенциал цветоножек флоральных эксплантов *R. dauricum*, возможно, связан с индуцированным при помощи ТДЗ перепрограммированием вставочных меристем на запуск процессов побегообразования. Подобный эффект перепрограммирования морфогенеза клеток под действием ТДЗ описан у многих видов рас-

тений (Gill, Saxena, 1993, Dutta-Gupta, Conger, 1998).

Предкультивирование стерильных флоральных эксплантов *R. dauricum* в течение 4 дней на безгормональной среде позволило увеличить частоту регенерации и сократить сроки появления морфогенного ответа на 3 недели. Повышение темпов регенерации после предкультивирования в течение 3-х дней на безгормональной среде наблюдали в культуре листовых дисков гибридов *Saintpaulia ionantha* × *confusa* (Lo et al., 1997 a, b). Авторы связывали этот эффект с возникновением «окна» компетенции для запуска процессов регенерации побегов или, так называемого, предкомпетентного периода, который включает 2 фазы: фазу реактивации и фазу дедифференциации (Lo et al., 1997 b). К.Х. Ло с соавторами предполагают, что именно во время фазы реактивации клетки экспланта приобретают чувствительность к экзогенным регуляторам роста (Lo et al., 1997 b).

Разработанная двухступенчатая система регенерации из флоральных эксплантов *R. dauricum* оказалась эффективной и при индукции морфогенеза из флоральных эксплантов *R. sichotense*. Регенерационный потенциал флоральных эксплантов *R. sichotense* оказался выше, чем у *R. dauricum*: для индукции морфогенеза из флоральных эксплантов *R. sichotense* достаточно использовать только ТДЗ без каких-либо других регуляторов роста, что объясняется большей способностью к пролиферации у тканей флоральных эксплантов *R. sichotense*, по сравнению с *R. dauricum*.

Таким образом, представленная двухступенчатая система регенерации побегов из флоральных эксплантов *R. dauricum* и *R. sichotense* открывает новые перспективы для дальнейшей селекции этих полиморфных морозоустойчивых видов.

ГЛАВА 6. УКОРЕНЕНИЕ И АДАПТАЦИЯ РЕГЕНЕРАНТОВ К УСЛОВИЯМ *EX VITRO*

Укоренение и адаптация регенерантов – заключительный и наиболее ответственный этап клонального микроразмножения растений. Культивирование растений в условиях *in vitro* способствует появлению ряда морфологических, анатомических и физиологических аномалий, которые затрудняют перевод растения в условия *ex vitro* (Pospisilova, 1999; Nazarika, 2006). В связи с этим побеги, полученные в культуре *in vitro* необходимо подготовить к переходу на автотрофное питание и пересадке в субстрат в условия *ex vitro*. Для стимуляции ризогенеза используют ауксины: ИУК, ИМК или НУК. В некоторых исследованиях доказана эффективность воздействия ИМК для укоренения микроклонов *Rhododendron* в условиях *in vitro* (Филипеня и др., 2009; Eeckhaut et al., 2010). В то же время, показана эффективность предобработки регенерантов в водном растворе ИМК с последующим культивированием побегов *in vitro* на АМ0 (Васильева, 2009) или *ex vitro* в смеси торфа и песка (Almeida et al., 2005). Затем растения с хорошо развитой корневой системой адаптируют к условиям *ex vitro* в емкостях с почвенной смесью. При этом, выбор того или иного способа укоренения и адаптации определяется экспериментально для каждого вида (Briggs et al., 1994).

Для завершения технологии клонального микроразмножения исследуемых генотипов необходимо разработать и оптимизировать протоколы укоренения и адаптации микропобегов, полученных нами из различных типов эксплантов (из проростков, листовых и флоральных эксплантов). Кроме уже заявленных объектов исследования, таких как *R. sichotense*, *R. dauricum*, *R. schlippenbachii* и *R. catawbiense* «Grandiflorum», мы использовали и другие красивоцветущие морозостойкие сорта, находящиеся в коллекции *in vitro* лаборатории биотехнологии ЦСБС: *R.* «Helsinki University», *R.* «Haaga». Разработка протоколов укоренения и адаптации этих объектов имеет не только практическое значение, так как результатом является получение высококаче-

ственного посадочного материала, но и позволяет выявить генотипические различия листопадных, полувечнозеленых и вечнозеленых групп рододендронов на этом этапе микроразмножения.

Укоренение регенерантов в условиях *in vitro*

Первоначальной задачей исследования стал подбор оптимального способа аппликации ИМК: (1) непосредственное культивирование на АМ, дополненной 25,0 мкМ ИМК или (2) 4-часовую импульсную обработку в растворе 148,0 мкМ ИМК с последующим переносом на АМ0.

В ходе анализа полученных данных установлено, что для всех исследуемых видов и сортов рододендронов наиболее эффективным способом укоренения оказалась импульсная обработка побегов в водном растворе 148,0 мкМ ИМК (рис. 22). При этом частота укоренения побегов под действием импульсной обработки более, чем в два раза превышает аналогичные показатели при укоренении на среде, содержащей 25,0 мкМ ИМК у всех испытанных генотипов. Нередко, под действием 25,0 мкМ ИМК на базальном конце некоторых микропобегов развивался каллус.

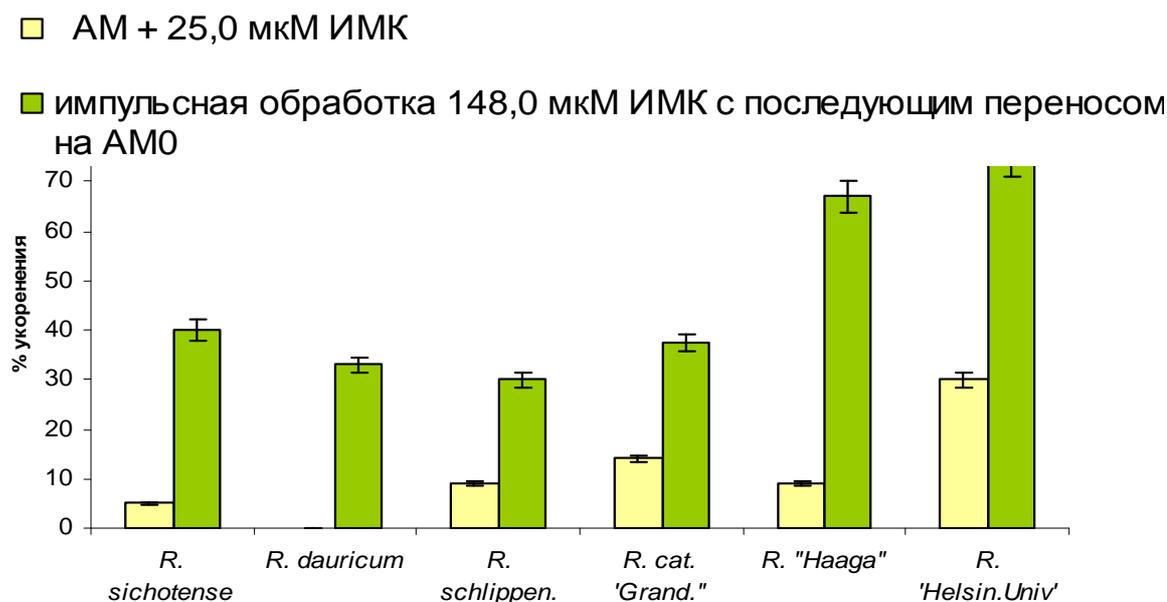


Рис. 22. Эффективность укоренения некоторых представителей рода *Rhododendron* в зависимости от способа аппликации ауксина (ИМК)

Максимальный процент укоренения в результате импульсной обработки выявлен у вечнозеленых сортов: у *R.* «Helsinki University» – 75 %, у *R.* «Наага» – 67 % (рис. 22, 23). Импульсная обработка микропобегов дикорастущих видов *R. sichotense*, *R. dauricum*, *R. schlippenbachii* несмотря на большую эффективность, по сравнению с непосредственным культивированием на АМ, дополненной 25,0 мкМ ИМК, вызвала ризогенез только у 30–40 % микропобегов. Невысокий процент укоренения в результате импульсной обработки был у побегов вечнозеленого сорта *R. catawbiense* «Grandiflorum» (см. рис. 22).

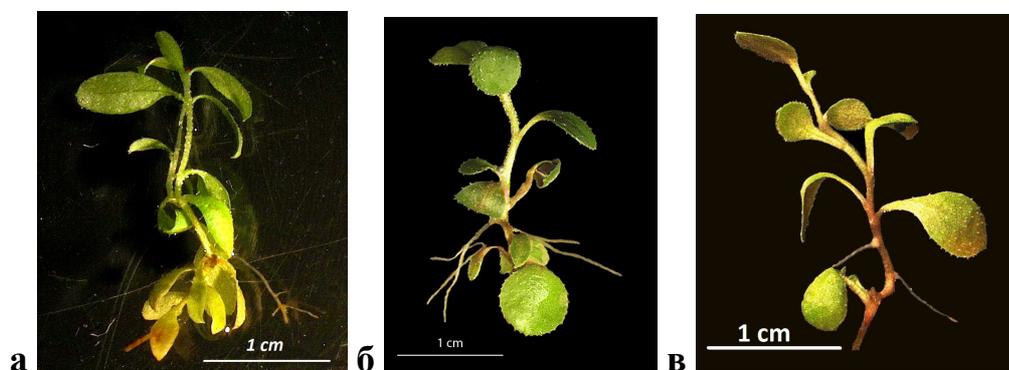


Рис. 23. Микроклоны, укорененные на безгормональной среде Андерсона после предобработки 148,0 мкМ ИМК: а – *R. sichotense*, б – *R.* «Helsinki University», в – *R.* «Наага»

Индукция ризогенеза на АМ, содержащей 25,0 мкМ (5,0 мг/л) ИМК, была предложена Б.А. Бриггсом с соавторами (Briggs et al., 1994), как эффективный способ укоренения вечнозеленых рододендронов в промышленных масштабах. В работах белорусских авторов показана эффективность более низких концентраций ИМК (1,0 и 2,0 мг/л) для индукции корнеобразования у вечнозеленых сортов рододендронов, включая сорта «Helsinki University» и «Наага» (Кутас, 2006, Филипня и др., 2009). Также отмечено и формирование каллуса наряду с развитием адвентивных корней, что может негативно отразиться в дальнейшем на адаптации этих растений к условиям *ex vitro* (Филипня и др., 2009). Использование импульсной обработки ИМК позволяет предотвратить каллусогенез.

Оптимизация этапа укоренения и адаптации регенерантов в условиях ex vitro

Известно, что корневая система, развившаяся в условиях *in vitro*, имеет ряд аномалий (Pospisilova, 1999; Nazarika, 2006). В связи с этим дальнейшие наши эксперименты были направлены на оптимизацию укоренения исследуемых видов рододендронов при помощи импульсной обработки ИМК в условиях *ex vitro*, что должно способствовать развитию полноценной корневой системы у регенерантов.

Для индукции ризогенеза использовали импульсную обработку микропобегов в водном растворе 148,0 мкМ ИМК. Затем растения, обработанные таким способом, помещали *ex vitro* в гидропонную установку или смесь торфа (рН = 4,0–5,0) и песка, в соотношении 1 : 1 (рис. 8 в гл. 2). Эффективность способов укоренения и адаптации оценивали соответственно по проценту укорененных растений и степени развития корневой системы, учитывая морфологические параметры.

Микропобеги *R. sichotense*, *R.* «Helsinki University» и *R.* «Haaga» укореняли с использованием лабораторной гидропонной установки. Анализ полученных результатов показал различия исследуемых генотипов. Повышение частоты укоренения в гидропонной установке отмечено у сортов, относящихся к группе вечнозеленых: *R.* «Helsinki University» и *R.* «Haaga», до 90 и 78 % соответственно. Микропобеги *R. sichotense*, напротив, укоренялись с меньшей частотой на гидропонике, чем на АМ0 (см. рис. 23, а). Эффективность использования гидропоники на этапе адаптации растений клонального происхождения показана во многих работах, при этом важным критерием является высота регенерантов (Nhut et al., 2006; Вечернина и др., 2008; Эрст и др., 2012). Полученные данные показывают перспективность применения гидропоники для укоренения и адаптации вечнозеленых представителей рода *Rhododendron*, в то время как для полувечнозеленых представителей следует искать более эффективный способ.

Для укоренения *R. sichotense*, *R. dauricum*, *R. schlippenbachii*, *R. catawbiense* «Grandiflorum» и *R.* «Helsinki University» после импульсной обработки использовали смесь торфа и песка. Использование этой смеси, как субстрата для укоренения после импульсной обработки, позволяет существенно увеличить выход укорененных, адаптированных растений. Так, процент укоренившихся растений сорта *R.* «Helsinki University» составил 100 %, *R. sichotense* – 84 %, а *R. dauricum* – 89 % (рис. 24, б). При этом корневая система растений при адаптации в смеси торфа и песка лучше развита по сравнению с растениями, укорененными в условиях *in vitro* (табл. 15, рис. 25).

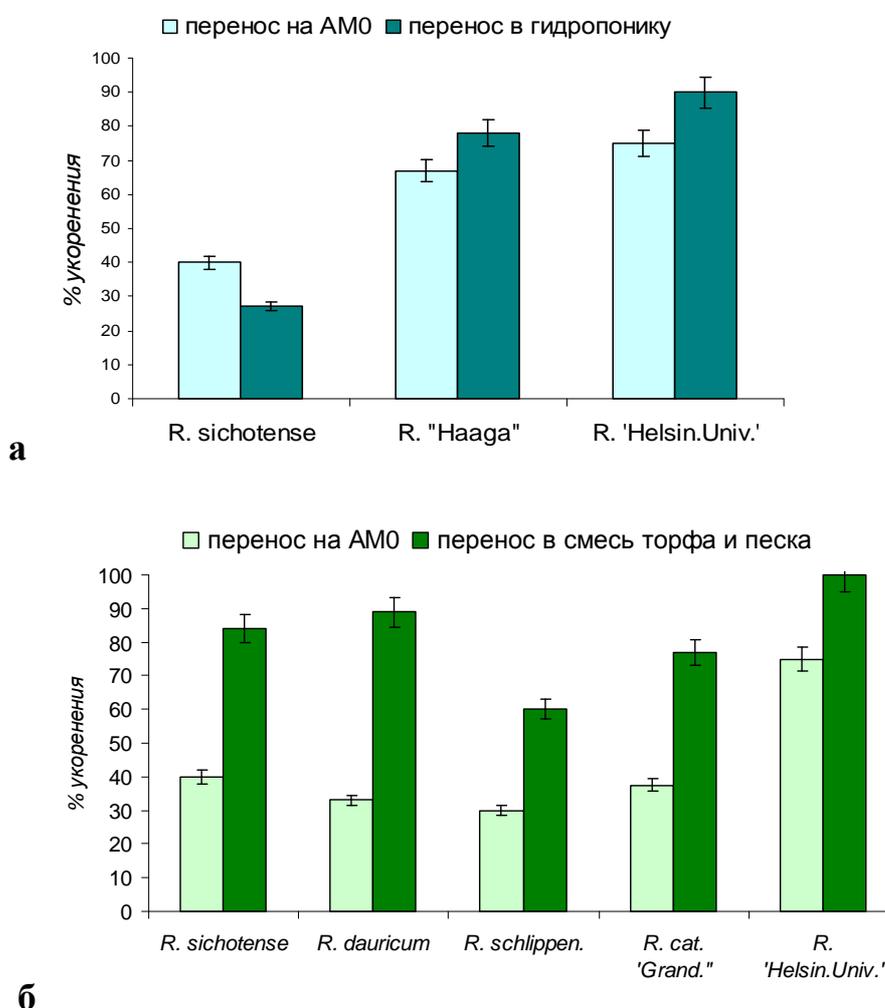


Рис. 24. Частота ризогенеза микропобегов представителей рода *Rhododendron*, индуцированного импульсной обработкой 148,0 мкМ ИМК, в зависимости от условий укоренения

Таблица 15

Влияние условий *in vitro* и *ex vitro* на степень развития корневой системы регенерантов некоторых представителей рода *Rhododendron* через 6 недель после импульсной обработки 148,0 мкМ ИМК в течение 4 часов

Вид или сорт	Способ укоренения	Количество корней, шт.	Длина корней, см	Растения с корнями 2-го порядка, %	Высота побегов, см
<i>R. dauricum</i>	<i>in vitro</i> на AM0 <i>ex vitro</i> (торф : песок)	2,00 ± 0,63 а 6,41 ± 0,61 b	0,72 ± 0,23 а 1,60 ± 0,09 b	40 88	1,32 ± 0,11 а 2,90 ± 0,22 b
<i>R. sichotense</i>	<i>in vitro</i> на AM0 <i>ex vitro</i> (торф : песок)	2,32 ± 1,01 а 6,33 ± 1,73 b	1,02 ± 0,61 а 1,71 ± 0,44 а	70 100	2,17 ± 0,52 а 2,64 ± 0,63 а
<i>R. schlippenbachii</i>	<i>in vitro</i> на AM0 <i>ex vitro</i> (торф : песок)	0,75 ± 0,11 а 1,08 ± 0,14 b	1,25 ± 0,25 а 3,78 ± 0,86 b	0 77	1,01 ± 0,09 а 1,61 ± 0,31 b
<i>R. cat. 'Grandiflorum'</i>	<i>in vitro</i> на AM0 <i>ex vitro</i> (торф : песок)	1,33 ± 0,21 а 4,00 ± 0,34 b	0,48 ± 0,03 а 0,59 ± 0,04 а	0 85	1,37 ± 0,10 а 1,73 ± 0,13 b
<i>R. 'Helsinki University'</i>	<i>in vitro</i> на AM0 <i>ex vitro</i> (торф : песок)	1,95 ± 0,34 а 5,48 ± 0,25 b	0,37 ± 0,02 а 1,03 ± 0,13 b	0 100	1,26 ± 0,35 а 1,70 ± 0,11 b

Примечание, Данные представлены в виде M ± m; значения, за которыми следуют одинаковые буквы, не имеют значимого отличия друг от друга в соответствии с тестом Дункана при p = 0,05.

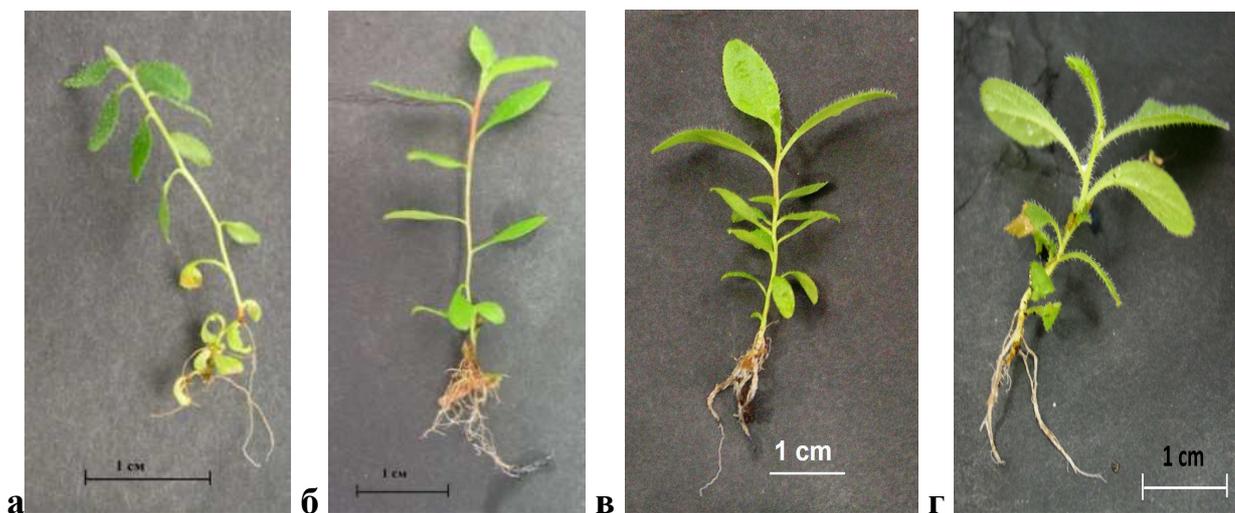


Рис. 25. Укорененные микропобеги *R. sichotense* при помощи импульсной обработки в условиях *in vitro* (а) и *R. sichotense* (б), *R. dauricum* (в) и *R. schlippenbachii* (г) в условиях *ex vitro*

Адаптированные к условиям *ex vitro* растения пересаживали в кассеты с почвенной смесью, а затем по мере роста в горшки и переносили в теплицу (рис. 26).



Рис. 26. Адаптированные растения в кассетах (а) и горшках (б)

Анализируя результаты проделанной работы по оптимизации этапов укоренения и адаптации можно сделать вывод, что импульсная обработка 148,0 мкМ ИМК в течение 4 ч с последующим укоренением *ex vitro* в смеси торфа и песка дала наибольший выход укорененных растений изучаемых

представителей рода *Rhododendron* (см. рис. 22–25). Укорененные таким способом растения имели более развитую корневую систему и адаптированные к условиям *ex vitro* надземные органы (см. рис. 25). Процент укоренившихся в условиях *in vitro* микрочеренков был значительно ниже, и таким растениям требовалась дополнительная адаптация к условиям *ex vitro*. В работах О.Г. Васильевой также показано, что замачивание микропобегов рододендронов на 4 часа в растворе, содержащем 30 мг/л (148 мкМ) ИМК, с последующим культивированием на безгормональной среде сокращает сроки укоренения и адаптации в два раза (Васильева, 2009). В то же время, в работах многих авторов показана эффективность укоренения в условиях *ex vitro*, поскольку в этих условиях растения формируют более развитую корневую систему, чем при *in vitro* укоренении (Bellamine et al., 1998; Borkowska, 2001; Yan et al., 2010). Укоренение *ex vitro* имеет ряд преимуществ: полноценное развитие корней, интенсивное развитие побегов и сокращение времени адаптации растений, что находит отражение в работах многих авторов (Leva, 2012, Benmahiou et al., 2012, Phulwaria, Shekhawat, 2013).

Подход, разработанный нами в представленной работе, включающий импульсную обработку микропобегов в растворе ИМК с последующим укоренением *ex vitro*, способствует значительному сокращению сроков адаптации и уменьшению стоимости высококачественного посадочного материала рододендронов клонального происхождения. Проведенные исследования выявили генотипические различия исследуемых представителей рода на этапе укоренения и адаптации в гидропонной установке. Укоренение и адаптация регенерантов в смеси торфа и песка – наиболее универсальный способ, эффективный как для вечнозеленых, так для полувечнозеленых и листопадных рододендронов.

ВЫВОДЫ

1. Семена, листовые и флоральные экспланты исследуемых представителей рода *Rhododendron* перспективны для введения в культуру и инициации прямого морфогенеза побегов. Доказана высокая активность ТДЗ, как индуктора морфогенеза у рододендронов вне зависимости от типа экспланта;
2. Показана эффективность использования семян *R. dauricum* и *R. schlippenbachii*, имеющих неглубокий тип покоя и высокую всхожесть, в качестве источников эксплантов для введения в культуру *in vitro*. Для массового получения микроклонов *R. dauricum* и *R. schlippenbachii* рекомендуется использовать среду АМ, дополненную 1,0 мкМ ТДЗ или 2,5 мкМ зеатина. Установлено, что ТДЗ (1,0 мкМ) и зеатин (1,0–5,0 мкМ) стимулируют как активацию пазушных меристем, так и закладку адвентивных почек, которые образуются на гипокотиле проростков;
3. Разработана система регенерации *R. sichotense* и *R. catawbiense* «Grandiflorum» из листовых эксплантов, основанная на высокой эффективности ТДЗ в низких концентрациях (0,1–1,0 мкМ), как триггера процессов дедифференциации клеток, с последующей регенерацией побегов *de novo*. Показана перспективность импульсной обработки ТДЗ для оптимизации стадий инициации и собственно размножения *R. catawbiense* «Grandiflorum»;
4. Установлено, что начальные этапы морфогенеза в культуре листовых эксплантов *R. catawbiense* «Grandiflorum» и *R. sichotense* происходят в эпидермальном слое адаксиальной стороны основания листовой пластины. Выявлены видовые различия дальнейших этапов морфогенеза: появлению почек у *R. sichotense* предшествует образование протуберанцев на поверхности эксплантов, а органогенез из листовых эксплантов *R. catawbiense* «Grandiflorum» проходит через формирование эмбриоидоподобных структур;

5. Впервые разработан метод введения в культуру флоральных эксплантов *R. dauricum* и *R. sichotense* с использованием предкультивирования на безгормональной АМ в течение 4-х дней. Дальнейшая индукция адвентивного побегообразования на цветоножках получена на средах с использованием 1,0 мкМ ТДЗ в сочетании с 2,5 мкМ зеатина для *R. dauricum* и 1,0 мкМ ТДЗ для *R. sichotense*. Показано, что предкультивирование на АМ0 позволяет ускорить получение морфогенного ответа и увеличить частоту регенерации.
6. Культивирование полученных регенерантов на АМ0 способствует элонгации побегов и преодолению аномалий, возникших под действием ТДЗ вне зависимости от типа экспланта;
7. Оптимизирована система укоренения исследуемых рододендронов, включающая импульсную обработку регенерантов с использованием 148,0 мкМ ИМК в течение 4 часов и перенос микропобегов в условия *ex vitro* на смесь торфа и песка (1:1). В результате удалось увеличить выход адаптированных растений с хорошо развитой корневой системой и сократить сроки получения качественного посадочного материала;
8. На основании выявленных закономерностей разработаны и оптимизированы протоколы клонального микроразмножения морозоустойчивых видов и сортов рода *Rhododendron*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Александрова, М.С. Рододендроны природной флоры СССР / М.С. Александрова. – М., 1975. – 112 с.

Александрова, М.С. Рододендроны флоры СССР и перспективы их культуры / М.С. Александрова // Бюл. ГБС. – 1976. – Вып. 99. – С. 3-10.

Александрова, М.С. Рододендроны / М.С. Александрова. – М., 2007. – 96 с.

Алексеева, Т.И. Растения Красной Книги России в коллекциях ботанических садов и дендрариев: материалы по Ботаническому саду МГУ / Т.И. Алексеева, Г.А. Бойко, Т. И. Варлыгина, Е.А. Захарова, К.В. Киселева, Е.В. Колюйков, С.В. Купцов, Г.А. Новицкая, Н.Б. Октябрева, Т.А. Остроумова, Е.И. Терентьева, И.О. Филатова, Шнер Ю.В. – М. : Изд. Гл. бот. сада РАН, 2005. – 144 с.

Батыгина, Т.Б. Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей / Т.Б. Батыгина // Физиол. растений. – 1999. – Т. 6, № 6. – С. 884-898.

Биотехнология растений: культура клеток и тканей / под ред. В.Н. Негрука. – М. : Наука, 1989. – 278 с.

Бутенко, Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р.Г. Бутенко. – М., 1964. – С. 272

Бутенко, Р.Г. Клеточная технология в сельскохозяйственной науке / Основы сельскохозяйственной биологии / Р.Г. Бутенко. – М. : Агропромиздат, 1990. – С. 154-235.

Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р.Г. Бутенко. – М. : ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.

Васильева, О.Г. Биолого-морфологические основы клонального микро-размножения некоторых представителей рода *Rhododendron* L.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.01 / Васильева Ольга Григорьевна. – М., 2009. – 20 с.

Вечернина, Н.А. Адаптация растений-регенерантов с использованием гидропоники / Н.Г. Вечернина, О.К. Таварткиладзе, И.Д. Бородулина, А.А. Эрст // Известия АлтГУ, 2008. – № 3 – С. 7-10.

Вологодина, О.С. Формовое разнообразие *Rhododendron sichotense* Rojark. (*Ericaceae*) в Приморском крае / О.С. Вологодина // Комаровские чтения. – Владивосток: Дальнаука. 2007. – Вып. 54. – С. 241-261.

Ворошилов, В.Н. Определитель растений Советского Дальнего Востока / В.Н. Ворошилов – М. : Наука, 1982. – С. 459-461.

Врищ, Д.Л. *Rhododendron schlippenbachii* Maxim. Формовое разнообразие, онтогенез / Д.Л. Врищ, Т.В. Роднова // Растения в муссонном климате. – Владивосток, 2009. – С. 253-258.

Врищ, Д.Л. Род рододендрон (*Rhododendron* L.) на Сихотэ-Алине: география, экология, генезис, хозяйственные перспективы / Д.Л. Врищ // Вестн. КрасГАУ. – 2010 а. – Вып. 10. – С. 64-71.

Врищ, Д.Л. Экология видов и форм рододендронов Сихотэ-Алиня / Д. Л. Врищ, И.С. Майоров, В.М. Урусов, Л.И. Варченко // Вестн. Тихоокеан. гос. экон. ун-та. – 2010 б. – № 4. – С. 110-124.

Врищ, Д.Л. Эколого-биологические особенности *Rhododendron schlippenbachii* Maxim. на северной границе ареала и перспективы использования его в озеленении / Д.Л. Врищ // Вестник ДВО РАН. 2011. – № 2. – С. 118-123.

Высоцкий В.А. Морфогенез и клональное микроразмножение растений / В.А. Высоцкий // Культура клеток растений и биотехнология. – М., 1986. – С. 91-102.

Галанин, А.В. Флора Сихотэ-Алинского биосферного заповедника (сосудистые растения) / А.В. Галанин, Г.П. Аверкова, В.Ю. Баркалов. – Владивосток: БСИ ДВО РАН, 2004. – 301 с.

Зайцева, Ю.Г. Клональное микроразмножение *Rhododendron dauricum* / Ю.Г. Зайцева, Т.И. Новикова // Вестник НГУ: биология, клиническая медицина. – 2014. – Вып. 12. – С. 26-32.

Зарубенко, А.У. Особенности плодоношения и семенная продуктивность рододендронов в условиях Киева / А.У. Зарубенко // Экологические проблемы семеноведения интродуцентов. – Рига, 1984. – С. 33-34.

Калинин, Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. – Киев: Наукова думка, 1980. – 320 с.

Калинин, Ф.Л. Технология микроклонального размножения растений / Ф.Л. Калинин. – Киев: «Наукова думка», 1992. – С. 137-190.

Карпова, Е.А. Флавоноиды некоторых видов рода *Rhododendron* L. флоры Сибири и Дальнего Востока / Е.А. Карпова, А.В. Каракулов // Химия растительного сырья. 2013. – №2 – С. 119-126.

Катаева, Н.В. Клональное микроразмножение растений / Н.В. Катаева, Р.Г. Бутенко. – М. : «Наука», 1983. – С. 38-39.

Кокшеева, И. М. Оптимизация методики проращивания семян представителей рода *Rhododendron* L. / И.М. Кокшеева // Вестник КрасГАУ. – 2009. – Вып. 3. – С.80-83.

Кондратович, Р.Я. Рододендроны в Латвийской ССР: биологические особенности культуры / Р.Я. Кондратович – Рига, 1981. – 303 с.

Коропачинский, И.Ю. Древесные растения Азиатской России / И.Ю. Коропачинский, Т.Н. Встовская. – Новосибирск: Изд-во СО РАН, фил. «Гео», 2002. – 708 с.

Красная книга Приморского края: растения. – Владивосток: Дальпресс, 2008. – 688 с.

Красная книга Российской Федерации: растения и грибы. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – 855 с.

Красная книга РСФСР. Растения. – М.: Росагропромиздат, 1988. – 590 с.

Красная книга СССР. – М. : Лесн. пром-сть, 1984. – Т. 2. – 480 с.

Кутас, Е.Н. Клональное микроразмножение рододендронов и их практическое использование / Е.Н. Кутас. – Минск, 2009. – 188с.

Куцев, М.Г. Реконструкция филогении рода *Rhododendron* L. (Ericaceae)

флоры России на основе последовательностей спейсеров ITS1-ITS2 / М.Г. Куцев, А.В. Каракулов // *Turczaninowia*. – 2010. – Вып. 13. – С. 59-62.

Мазуренко, М.Т. Рододендроны Дальнего Востока / М.Т. Мазуренко. – М. : Наука, 1980. – 231 с.

Николаева, М. Г. Покой семян / М.Г. Николаева // Физиология семян. М. 1985. – С. 125-183.

Николаева, М.Г. Справочник по проращиванию покоящихся семян / М.Г. Николаева, М.В. Разумова., В.Н. Гладкова. – Ленинград, 1985. – 346 с.

Новикова, Т.И. Использование биотехнологий для размножения декоративных растений / Т.И. Новикова // Известия ИГУ. Серия «Биология. Экология» 2011. – Т. 4. – № 2. – С. 74-80.

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

Паушева, З.П. Практикум по цитологии растений / З.П. Паушева. – М. : Колос. 1988. – 272 с.

Петухова, И.П. Рододендроны на юге Приморья. Интродукция, культура / И.П. Петухова. – Владивосток, 2006. – 131 с.

Полубоярова, Т.В. Регенерация побегов из тканей цветка *Allium altissimum* (Alliaceae) в культуре *in vitro* / Т.В. Полубоярова, Е.В. Андропова, Т.И. Новикова, Г.Ю. Виноградова // Раст. ресурсы. 2011. – Вып. 3. – С. 33-42.

Пояркова, А.И. Семейство *Ericaceae* D.K. – вересковые / А.И. Пояркова // Флора СССР. – М. ; Л., 1952. – Т. 18. – 802 с.

Растения Красной книги России в коллекциях ботанических садов и дендрариев. – Тула: ИПП Гриф и К, 2005. – 144 с.

Растительные ресурсы России: дикорастущие цветковые растений, их компонентный состав и биологическая активность / под ред. А.Л. Буданцева. – СПб.; М., 2009. – Т. 2. – 513 с.

Семенюк, Н.Б. Рододендрон Ледебура и применение его в декоративном садоводстве Западной Сибири / Н.Б. Семенюк. – Барнаул, 1988. – 87 с.

Сидоренко, О.Д. Экологизация сельскохозяйственного производства / О.Д. Сидоренко // Материалы науч. конф. Анапа, 1995. – С. 200-204.

Сосудистые растения советского Дальнего Востока. – СПб.: Наука, 1991. – Т. 5. – 390 с.

Тихонова, Н.А. Морфологическая и генетическая дифференциация видов рода *Rhododendron* в горах Южной Сибири. Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.01 / Тихонова Наталья Александровна. – Красноярск, 2013. – 18 с.

Усенко, Н.В. Деревья и кустарники Дальнего Востока: справочная книга (3-е изд., перераб. и доп.) / Н.В. Усенко. – Хабаровск: Изд. дом Приамурские ведомости, 2010. – 272 с.

Филипеня, В.Л. Микрклональное размножение *Rhododendron × hybridum hort* / В.Л. Филипеня, В.И. Горбацевич, Т.В. Антипова // Физиология и биохимия культурных растений. – 2009 – Т.41, №6. – С. 516 – 522.

Харкевич, С.С. Редкие виды растений советского Дальнего Востока / С.С. Харкевич, Н.Н. Качура. – М. : Наука, 1981. – 232 с.

Хохряков, А.П. Сем. Вересковые – *Ericaceae* / А.П. Хохряков, М.Т. Мазуренко // Сосудистые растения советского Дальнего Востока. – СПб. : Наука, 1991. – Т. 5. – С.165-166.

Центалович, В.Г. Особенности морфологии и биологии семян рододендрона сихотинского / В.Г. Центалович // Экологические проблемы семеноведения интродуцентов. – Рига, 1984. – С. 134.

Эрст, А.А. Адаптация регенерантов *Rhododendron hybridum* к условиям *ex vitro* / А.А. Эрст, Т.И. Новикова, А.В. Каракулов, Ю.Г. Зайцева // Научные ведомости БелГУ: естественные науки. – 2012. – №9 (129). – Вып. 19. – С. 44-49.

Aasim, M. In vitro shoot regeneration of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) using different cytokinins / M. Aasim, N. Hussain, E.M. Umer, M. Zubair, S.B. Hussain, S. Saeed, T.S. Rafique, C. Sancak // African Journal of Biotechnology. – 2010. – Vol. 9. – P. 7174-7179.

Ahmad, N. An Efficient and Reproducible Method for in vitro Clonal Multiplication of *Rauvolfia tetraphylla* L. and Evaluation of Genetic Stability using DNA-Based Markers / N. Ahmad, M. Anis // *Appl Biochem Biotechnol.* – 2012. – Vol. 168. – P. 1739-1752.

Ahuja, M.R. Somatic cell genetics of woody plants / M.R. Ahuja – Dordrecht: Kluwer academic publishers, 1988. – 225 p.

Ahuja, M.R. Biotechnology in forest trees / M.R. Ahuja // *Plant res. & Development.* – 1991. – Vol. 23. – P. 106-120.

Ahuja, M.R. Woody plant biotechnology / M.R. Ahuja – New York: Plenum press, 1991. – 373 p.

Ahuja, M.R. Micropropagation a la carte / M.R. Ahuja // *Micoropropagation of woody plants.* – Netherlands: Kluwer academic publishers, 2010. p. 3-9.

Almeida, R., In vitro micropropagation of endangered *Rhododendron ponticum* L. subsp. *baeticum* (Boissier and Reuter) Handel-Mazzetti / R. Almeida, S. Goncalves, A. Romano // *Biodiversity and Conservation.* – 2005. – №14. – P. 1059-1069.

Anderson, W.C. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of rhododendron / W.C. Anderson // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* – 1984. – Vol. 109. – P. 343-347.

Ashby, W. C. Silver maple tree improvement for biomass production / W.C. Ashby, J.E. Preece, C.A. Huetteman, D.F. Bresnan, P.L. Roth // *Proc. 5th North Central Tree Imp. Conf.* – 1987. – P. 6-23.

Bajaj, Y.P.S. Biotechnology in agriculture and forestry 5. Trees II / Y.P.S. Bajaj. – Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1989. – 622 p.

Banerjee, N. Ontogenesis of in vitro shoot bud proliferation in *Solanum sarachoides* Sendt. / N. Banerjee, S. Mukhopadhyay, A.K. Sharma // *Proceedings of the Indian Academy of Sciences. (Plant Science).* – 1989. – Vol. 99. – P. 307-312.

Bazabakana, R. Effect of jasmonic acid on developmental morphology during in vitro tuberization of *Dioscorea alata* (L.) / R. Bazabakana, R. Wattiez, M. Baucher¹, B. Diallo, M. Jaziri¹ // *Plant Growth Regulation.* – 2003. – Vol. 40. – P. 229-237.

Bates, S. Thidiazuron stimulates shoot organogenesis and somatic embryogenesis in white ash (*Fraxinus Americana* L.) // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 1992. – Vol. 31. – P. 21-29.

Bellamine, J. Confirmation of the role of auxin and calcium in the late phases of adventitious root formation / J. Bellamine, C. Penel, H. Greppin, T. Gaspar // Plant Growth Regul. – 1998. – Vol. 26 – P. 191-194.

Benmahioul, B. Micropropagation and ex vitro rooting of Pistachio (*Pistacia vera*) / B. Benmahioul, N. Dorion, M. Kaid-Harche, F. Daguin // Plant Cell, Tiss. Organ Cult. – 2012. – Vol. 108 – P. 353-358.

Berg, J. Rhododendron und immergrüne Laubgehölze / J. Berg, L. Heft. – Stuttgart, 1969. – 288 p.

Bojarczuk, K. Micropropagation of rhododendrons / K. Bojarczuk // Acta Hort. – 1989. – P. 241-247.

Bonga, J.M. In vitro propagation of conifers: fidelity of the clonal offspring / J.M. Bonga // Woody plant biotechnology. – New York: Plenum press, 1991. – P. 13-21.

Borkowska, B. Morphological and physiological characteristics of micropropagated strawberry plants rooted *in vitro* or *ex vitro* / B. Borkowska // Sci Hort. – 2001. Vol. 89. – P. 195-206

Brand, M. H. In vitro rejuvenation of *Betula* (*Betulaceae*): Biochemical evaluation / M. H. Brand, R. D. Lineberger // American Journal of Botany. – 1992 – Vol. 79 –P. 626-635.

Brand, M.H. The induction of tissue proliferation-like characteristics in *in vitro* cultures of Rhododendron ‘Montego’ / M.H. Brand, R. Kiyomoto // Hort Sci. – 1997 – Vol. 32. – P. 989-994.

Briggs, B.A. Micropropagation of azaleas using thidiazuron / B.A. Briggs // Acta Hort. – 1988. – Vol. 227. – P. 330-333.

Briggs, B.A. In vitro propagation of Rhododendron / B.A. Briggs, S.M. McCulloch, L.A. Caton // Acta Horticulturae. – 1994. – Vol. 364. – P. 21-26.

Bruyn, M.D. *In vitro* propagation *Amarallis belladonna* / M.D. Bruyn, D.I.

Ferreira, M.M. Slabbert, J. Pretorius // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 1992. Vol. 31. – P. 179-184.

Burkhart, L.F. In vitro establishment, shoot multiplication, and rooting of *Pinus strobus*, *Pseudotsuga menziesii*, and *Thuja occidentalis* “Hetz Wintergreen” / L.F. Burkhart // HortScience – 1990. – Vol. 26. – P. 749.

Burritt, D. Organogenesis in cultured petiole explants of *Begonia x erythrophylla*: the timing and specificity of the inductive stimuli / D.Burritt, D.W.M. Leung // Journal of Experimental Botany. – Oxford. – 1995. Vol. 47. – P. 557-567.

Cantos, M. The use of in vitro culture to improve the propagation of *Rhododendron ponticum* subsp. *Baeticum* (Boiss. & Reuter) / M. Cantos, J. Linan, J.L. Garcia, M. GarciaLinan, M.A. Dominguez, A.Troncoso // Central Europ. J. Biol. – 2007. – Vol. 2. – P. 297-306.

Capelle, S.C. Effect of thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism on N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)[8-¹⁴C] adenosine in callus tissues of *Rhaseolus lunatus* L. / S.C. Capelle, D.W.S. Mok, S.C. Kirchner, M.C. Mok // Plant phisiol. – 1983. – Vol. 73. – P. 796-802.

Chamberlain, D.F. A revision of *Rhododendron* II. Subgenus *Hymenanthes* / D.F. Chamberlain // Notes Roy. Bot. Gard. Edinburgh. – 1982. – Vol. 39. – P. 209-486.

Chamberien, D. The genus *Rhododendron*, its classification and synonymy / D. Chamberien. – Edinburgh, 1996 – 181 p.

Christianson, M.L. Competence and determination in the process of in vitro shoot organogenesis / M.L. Christianson, D.A. Warnik // Dev. Biol. – 1983. – Vol. 95. – P. 288-293.

Christianson, M.L. Phenocritical times in the process of in vitro shoot organogenesis / M.L. Christianson, D.A. Warnik // Dev. Biol. – 1984. – Vol. 101. – P. 382-390.

Christianson, M.L. Temporal requirement for phytohormone balance in the control of organogenesis in vitro / M.L. Christianson, D.A. Warnik // Dev. Biol. / 1985. – Vol. 112. – P. 494-497.

Coleman, W.K. Enhancement of cold hardiness in apple trees by paclobutrazol, thidiazuron and flurprimidol / W.K. Coleman, E.T. Estabrooks // *Can. J. Plant Sci.* – 1992. – Vol. 72. – P. 1267-1274.

Conner, A.J. Re-establishing plantlets from tissue culture a review / A.J. Conner, M.B. Thomas // *Comb. Proc. Int. Pl. Prop. Soc.* – 1982 – Vol. 31. – P. 342-357.

Dabin, P. Application of in vitro cultures in azalea (*Rhododendron sim-sii* Planch) / P. Dabin, J. Bouharmont // *Acta Hort.* – 1983. – Vol. 131. – P. 89-93.

Dai, C. Micropropagation of *Rhododendron prinophyllum* by ovary culture / C. Dai, V.N. Lambeth, R. Taven, D. Mertz // *HortSci.* – 1987. – Vol. 22. – P. 491-493.

Debergh, P.C. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture / P. C. Debergh, L. J. Maene // *Scientia Hort.* – 1981. – Vol. 14. – P. 335-345.

Debergh, P.C. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium / P.C. Debergh // *Physiol. Plant* – 1983. – Vol. 59. – P. 270-276.

Debergh, P. Micropropagation of woody species state of the art on in vitro aspects / P. Debergh // *ActaHort.* – 1988. – Vol. 227. – P. 287-295.

Dutta Gupta, S. In vitro dedifferentiation of multiple shoot clumps from intact seedlings of switchgrass / S. Dutta Gupta, B.V. Conger // *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* – 1998. – Vol. 34. – P. 196-202.

Economou, A.S. In vitro shoot proliferation of Minnesota deciduous azaleas / A.S. Economou, P.E. Read // *Hort Sci* – 1984. – Vol. 19. – C.60-61.

Eeckhaut, T. Micropropagation of *Rhododendron* / T. Eeckhaut, K. Janssens, E. Keyser, J. Riek // *Protocols for in vitro propagation of ornamental plants: Methods in molecular biology.* – 2010. – Vol. 589. – P. 141-152.

Ettinger, T.L. Aseptic micropropagation of *Rhododendron* P.J.M. hybrids / T.L. Ettinger, J.E. Preece // *J. Hort. Sci.* – 1985. – Vol. 60. – P. 269-274.

Fasolo, F. Adventitious shoot formation on excised leaves of in vitro grown shoots of apple cultivars / F. Fasolo, R.H. Zimmerman, I. Fordham // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 1989. – Vol.16. – P. 75-87.

Feher, A. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state / A. Feher, T. Pasternak, D. Dudits // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 2003. – Vol. 74. – P. 201-228.

Fiola, J.A. Effect of thidiazuron, light fluence rates and kanamycin on in vitro shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves / M.A. Hassan, H.J. Swartz, R.H. Bors, R. McNicol // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 1990. – Vol. 20 – P. 223-228.

Fordham, I. Axillary and adventitious shoot proliferation of Exbury azaleas in vitro / I. Fordham, D. P. Stimart, R. H. Zimmerman // *HortScience* – 1982. Vol. 17. – P. 738-739.

Gaba, V. In vitro studies on the anatomy and morphology of bud regeneration in melon cotyledons / V. Gaba, E. Schlarman, C. Elman, O. Sagee, A.A. Watad, D.J. Gray // *In Vitro Cell. Dev. Biol.- Plant.* – 1999. Vol. 35. – P.1-7.

Gabbar, A. Enhancement of ethylene biosynthesis and germination by cytokinins and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in *Striga asiatica* seeds / A. Gabbar, T. Babiker, L. G. Butler, et al. // *Physiol. Plant.* – 1993. Vol. 89. – P. 21-26.

Geneve, R. Propagation from nonmeristematic tissues – organogenesis /, R. Geneve // *Plant tissue culture, development and biotechnology* (Eds. R.N. Trigiano, D.J. Gray). – London : CRC Press, 2011. – P. 245-259.

George, E.F. Micropropagation: uses and methods / E.F. George, P.C. Debergh // *Plant propagation by tissue culture.* – Netherlands: Springer, 2008. – P. 29-64.

George, E.F. *Plant propagation by tissue culture* / George E.F. – Edington, UK: Exegetics Ltd., 1996. – 501 p.

Gill, R. Somatic embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L: Induction by thidiazuron of direct embryo differentiation from cultured leaf discs / R. Gill, P.K. Saxena // *Plant Cell Rep.* – 1993. – Vol. 12. – P.154-159.

Graner, E.M. TDZ pulsing evaluation on the in vitro morphogenesis of peach palm / G.P. Oberschelp, G.E. Brondani, K.D. Batagin-Piotto, C.V. de Almeida, M. de Almeida // *Physiol Mol Biol Plants.* – 2013. – Vol. 19. – P. 283-288.

Gray, D.J. In vitro micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*) / D.J. Gray, C.M. Benton // Plant cell tissue organ culture. – 1991. – Vol. 27. – P. 7-14.

Gueye, B. Acquisition of callogenic capacity in date palm leaf tissues in response to 2,4-D treatment / B. Gueye, F. Morcillo, M. Collin, D. Gargani, P. Overvoorde, F. Aberlenc-Bertossi, T.J. Tranbarger, D. Sane, J.W. Tregear, A. Borgel, J. Verdeil // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 2009. – Vol. 99. – P. 35-45.

Guo, B. Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator / B. Guo, B.H. Abbasi, A. Zeb, L.L. Xu, Y.H. Wei // African journal of biotechnology. – 2011. – Vol. 10 (45) – P. 8984-9000.

Hazarika, B.N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants / B.N. Hazarika // Scientia Horticulturae. – 2006. – Vol. 108. – P. 105-120.

Hebert, C.J. In Vitro Shoot Regeneration and Polyploid Induction of Rhododendron 'Fragrantissimum Improved' / C. J. Hebert, D. H. Touchell, T. G. Ranney, A.V. LeBude // Hortscience. – 2010. – Vol. 45. 0 P. 801-804.

Hicks, G.S. Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination / G.S. Hicks // Botanical Review. – 1980. – Vol. 46. – P. 1-23.

Hosseini-Nasr, M. Thidiazuron-induced shoot-bud formation on root segments of Albizzia julibrissin is an apex-controlled, light independent and calcium-mediated response / M. Hosseini-Nasr // Plant growth regul. – 2000. – Vol. 36. – P. 81-85.

Hsia, C.N. The influence of cytokinins and ionic strength of Anderson's medium on shoot establishment and proliferation of evergreen azalea / C.N. Hsia, S.S. Korban // Euphytica. – 1997. – Vol. 93. – P. 11-17.

Huetteman C.A. In vitro culture of Juglans nigra L.: Micropropagation from embryonic axes and forcing of adult quiescent stem / C.A. Huetteman // MS Thesis. Southern Illinois University: Carbondale. – 1988.

Huetteman, C.A. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture / C.A. Huetteman, J.E. Preece // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1993. – Vol. 33. – P. 105-119.

Hutchinson, J.M. Acetylsalicylic acid enhances and synchronized thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium tissue cultures / J.M. Hutchinson, P.K. Saxena // *Plant Cell Rep.* – 1996 a. – Vol. 15. – P. 512-515.

Hutchinson, J.M. Morphoregulatory role of thidiazuron: evidence of the involvement of endogenous auxin in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) / J.M. Hutchinson, S. J. Murch, P.K. Saxena // *J. Plant Physiol.* – 1996 b. – Vol. 149. – P. 573-579.

Iapichino, G. Adventitious shoot formation from leaf explants of rhododendron / G. Iapichino, S. McCulloch, T.H.H. Chen // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 1992. – Vol. 30. – P. 237-241.

Iapichino, G. Adventitious shoot production from a vireya hybrid of rhododendron / G. Iapichino, T.H. Chen, L.H. Fuchigami // *Hort. Sci.* – 1991. – Vol. 26. – P. 594-596.

Imel, R.I. Adventitious shoot formation from recultured leaves of *Rhododendron* / R.I. Imel, J.E. Preece // *HortScience.* – 1988. – Vol. 23. – P. 104.

Jones, M.P.A. The mode of action of thidiazuron: auxins, indoleamines, and ion channels in the regeneration of *Echinacea purpurea* L. / M.P.A. Jones, J. Cao, R. O'Brien, S.J. Murch, P.K. Saxena // *Plant Cell Rep.* – 2007 a. – Vol. 26. – P. 1481-1490.

Jones, M.P.A. Thidiazuron induced regeneration of *Echinacea purpurea* L. micropropagation in solid and liquid culture systems / M.P.A. Jones, Z. Yi, S.J. Murch, P.K. Saxena // *Plant Cell Rep.* – 2007 b. – Vol. 26 – 3. 13-19.

Kamenicka, A. A comparative study of different cytokinins on the formation of *Rhododendron forrestii* Bait'. f. ex Diels. axillary shoots in vitro / A. Kamenicka, J. Valka, G. Vizarova // *ACTA Rhysiologiae Plantarum.* – 1998. – Vol. 20, № 2. – P. 167-17

Kane, M.E. Shoot culture procedures / M.E. Kane // *Plant development and biotechnology.* – CRC Press LCC, 2005. – P. 145-158.

Khan, E.U. Regeneration and characterization of plants derived from leaf in vitro culture of two sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) cultivars / E.U. Khan, X-Z. Fu, J. Wang, Q-J. Fan, X-S. Huang, G-N. Zhang, J. Shi, J-H. Liu // *Scientia Horticulturae*. – 2009. – Vol. 120. – P. 70-76.

Kim, M.K. High-frequency induction of adventitious shoots from hypocotyl segments of *Liquidambar styraciflua* L. by thidiazuron / M.K. Kim, H.E. Sommer, B.C. Bongarten, S.A. Merkle // *Plant Cell Rpt.* – 1997. – Vol. 16. – P. 536-540.

Kita, K. Intergeneric hybridization between *Menziesia* and *Rhododendron* based on molecular phylogenetic data / K. Kita, Y. Kurashige, T. Yukawa, S. Nishimura, T. Handa // *J. Japan Soc. Hort. Sci.* – 2005. – Vol. 74 – P. 51-56.

Kurczyńska, E.U. Histological analysis of direct somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) / E.U. Kurczyńska, M.D. Gaj, A. Ujczak, E. Mazur // *Heynh. Planta*. – 2007. – Vol. 226, № 3. – P. 619-628.

Laloue, M. Cytokinin oxidase from wheat / M. Laloue, J.E. Fox // *Plant physiol.* – 1989. – Vol. 90. – P. 899-906.

Laux, T. Stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot meristem is regulated by intercellular movement of *CLAVATA3* and its sequestration by *CLAVATA1* / T. Laux, M. Lenhard // *Development* – 2003. – Vol. 130. – P. 3163-3173.

Leva, A. Innovative protocol for “*ex vitro* rooting” on olive micropropagation / A. Leva // *Cent. Eur. J. Biol.* – 2012. – Vol. 6. – P. 352-358.

Li, H. Thidiazuron-induced de novo shoot organogenesis on seedlings, etiolated hypocotyls and stem segments of Huangqin / H. Li, S.J. Murch, P.K. Saxena // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 2000. – Vol. 62. – P. 169-173.

List of rare threatened and endemic plants in Europe. – Strasburg: Council of Europe, 1977. – 286 p.

Lloyd, G.B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture / G.B. Lloyd, B.H. McCown // *Comb. Proc. Int. Plant. Prop. Soc.* – 1980. – Vol. 30. – P. 421-426.

Lo, K.H. Acquisition of competence for shoot regeneration in leaf disc of

Saintpaulia ionantha x *confusa* hybrid (African violet) cultured in vitro / K.H. Lo, K.L. Giles, V.K. Sawhney // Plant Cell Reports. – 1997 a. – Vol. 16. – P. 416-420.

Lo, K.H. Histological changes associated with acquisition of competence for shoot regeneration in leaf discs of *Saintpaulia ionantha* x *confusa* hybrid (African violet) cultured in vitro / K.H. Lo, K.L. Giles, V.K. Sawhney // Plant Cell Reports – 1997 b. – Vol. 16 – P. 421-425.

Lu, C.Y. The use of TDZ in tissue culture / C.Y. Lu // In Vitro Cell. Dev. Biol. – 1993. – Vol. 29. – P. 92-96.

Madden, J.I. Modes of regeneration in *Pelargonium xhortorum* (*Geraniaceae*) and three closely related species / J.I. Madden, C.S. Jones, C.A. Auter // In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant. – 2005. – Vol. 41, № 1. – P. 37-46.

Malik, K.A. Thidiazuron induces high frequency shoot regeneration in intact seedlings of pea (*Pisum sativum*), chickpea (*Cicer arietinum*) and lentil (*Lens culinaris*) / K.A. Malik, P.K. Saxena // Aust J Plant Physiol. – 1992. – Vol. 19. – P. 731-740.

Matand, K. Evaluation of peanut genotypes for in vitro plant regeneration using thidiazuron / K. Matand, C.S. Prakash // J. Biotechnol. – 2007. – Vol. 130. – P. 202-207.

Matysiak, B. Carbon dioxide enrichment, light, and mineral nutrition for stimulation of growth of in vitro propagated Gerbera / B. Matysiak, J. Nowak // Propag. Ornament. Plants. – 2001. – Vol. 1. – P. 20-24.

McCown, B.H. A survey of the response of Rhododendron to in vitro culture / B.H. McCown, G.B. Lloyd // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 1983. – Vol. 2. – P. 77-85.

Meng, R. Improving in vitro plant regeneration from leaf and petiole explants of 'Marion' blackberry / R. Meng, T.H.H. Chen, C.E. Fin, Y. Li // HortScience – 2004. – Vol. 39 – P. 316-320.

Mertens, M. In vitro regeneration of evergreen azalea from leaves / M. Mertens, S. Werbrouck, G. Samyn, H. Botelho, P. Debergh // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 1996. – Vol. 45. – P. 231-236.

Meyer, M.M., In vitro propagation of *Rhododendron catawbiense* from flower buds /, M.M. Meyer // HortScience – 1982. – Vol. 17. – P. 891-892.

Miller, L.R. Tissue culture propagation of tropical foliage plants / L.R. Miller, T. Murashige. // In Vitro. – 1976. – Vol. 12. – P. 797-813.

Mithila, J. Thidiazuron induces shoot organogenesis at low concentrations and somatic embryogenesis at high concentrations on leaf and petiole explants of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) /, J. Mithila, J.C. Hall, J.M.R. Victor, P.K. Saxena // Plant Cell Rpt. – 2003. – Vol. 21. – P. 408–414.

Mok, M.C. Cytokinin activity of Nphenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-ylurea (TDZ) / M.C. Mok, D.W.S. Mok, D.J. Armstrong // Phytochemistry. – 1982. – Vol. 21. – P. 1509-1511.

Mok, M.C. The metabolism of [14C]-TDZ in callus cultures of *Phaseolus lunatus* / M.C. Mok, D.W.S. Mok // Physiol Plant. – 1985. – Vol. 65. – P. 427-432.

Murashige, T. Propagation of *Asparagus* through shoot apex culture / T. Murashige, M.N. Shabde, P.M. Hasegawa, F.H. Takatori, J.B. Jones // Hort. Sci. – 1972. – Vol. 97. – P. 158-161.

Murashige, T.A. revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, T.A. Skoog // Plant Physiol. – 1962. – Vol. 15. – P. 473-497.

Murch, S.J. Molecular fate of thidiazuron and its effects on auxin transport in hypocotyls tissues of *Pelargonium x hortorum* Bailey / S.J. Murch, P.K. Saxena // Plant Growth Regul. – 2001 a. – Vol. 35. – P. 269-275.

Murch, S.J. Somatic cell fusion: relevance to medicinal plants / S.J. Murch, P.K. Saxena // Development of Plantbased Medicines: Conservation, Efficacy and Safety. – Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2001 b. – P. 167-182.

Murthy, B.N.S. Thidiazuron-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogea*): Endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons / B.N.S. Murthy, S.J. Murch, P.K. Saxena // Physiol. Plantarum. – 1995. – Vol. 94. – P. 268-276.

Murthy, B.N.S. Thidiazuron: A potent regulator of in vitro plant morphogenesis / B.N.S. Murthy, S.J. Murch, P.K. Saxena // *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* – 1998. – Vol. 34. – P. 267-275.

Murthy, B.N.S. Characterization of somatic embryogenesis in *Pelargonium hortorum* mediated by a bacterium / B.N.S. Murthy, N.N. Vettakkorumakankav, S. KrishnaRaj, J. Odumera, P.K. Saxena // *Plant Cell Rep.* – 1999. – Vol. 18. – P. 607-613.

Nhut, D.T. Liquid culture as a positive condition to induce and enhance quality and quantity of somatic embryogenesis of *Lilium longiflorum* / D.T. Nhut, N.T.M. Hahn, P.Q. Tuan, T.M. Nguyet, N.T.H. Tram, N.C. Chinh, N.H. Nguyen, D.N. Vinh // *Sci. Hortic.* – 2006. – Vol. 110. – P. 93-97.

Nieuwkerk, J.P. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation in vitro / J.P. Nieuwkerk, R.H. Zimmerman, I. Fordham // *HortScience* – 1986. – Vol. 21. – P. 516-518.

Ozden-Tokatli, Y. Development of encapsulation techniques for the production and conservation of synthetic seeds in ornamental plants. / Y. Ozden-Tokatli, A. De Carlo, F. Gumusel, S. Pignattelli, M. Lambardi // *Prop. Ornam. Plants.* – 2008. – Vol. 8. – P. 13-16.

Pascual, L. A liquid 2,4-D pulse increased shoot and root regeneration from leaf explants / L. Pascual, J.A. Marin // *Scientia Horticulturae* – 2005. – Vol. 106. – P. 582-592.

Pavingerova, D. The influence of thidiazuron on shoot regeneration from leaf explants of fifteen cultivars of *Rhododendron* / D. Pavingerova // *Biol. Plantarum.* – 2009. – Vol. 54. – P. 797-799.

Phulwaria, M. An efficient in vitro shoot regeneration from immature inflorescence and rooting of *Arnebia hispidissima* (Lehm). Dc. – A red dye (Alkannin) yielding plant / M. Phulwaria, N.S. Shekhawat // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* – 20013. – Vol. 19. – P. 435-441.

Piqueras, A. Explants Used for the Generation of Transgenic Plants / A. Piqueras, N. Albuquerque, K.M. Folta // *Transgenic Crop Plants.* – Berlin Heidelberg : Springer-Verlag, 2010. – P. 31-56.

Pogany, M.F. Phenotypic variation during micropropagation of the chimeral *Rhododendron* 'President Roosevelt' / M.F. Pogany, R.D. Lineberger // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 1990. – Vol. 21. – P. 201-209.

Pospisilova, J. Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions / J. Pospisilova, I. Ticha, P. Kadlec, D. Haisel, S. Plzakova // *Biologia Plantarum.* – 1999. – Vol. 42. – P. 481-497.

Preece, J.E. Plant regeneration from leaf explants of *Rhododendron* 'P.J.M. Hybrids' / J.E. Preece, M.R. Immel // *Sci. Hort.* – 1991. – Vol. 48. – P. 159-170.

Preil, W. Meristem culture of azaleas (*Rhododendron simsii*) / Preil W, Engelhardt M // *Acta Hort.* – 1977. – Vol. 78. – P. 203-208.

Preece, J.E. Acclimatization of micropropagated plants to greenhouse and field / J.E. Preece, E.G. Sutter // *Micropropagation technology and application.* – Boston: Kluweracademic publisher, 1991 a. – P. 71 -93.

Preece, J.E. Micro- and cutting propagation of silver maple I Results with adult and juvenile propagules / J.E. Preece, C.A. Huetteman, W.C. Ashaby, P.L. Roth // *J. Am. Soc. Hort. Sci.* – 1991 b. – Vol. 116. – P. 142-148.

Radice, S. In vitro organogenesis in leaves of azaleas 'Petrick' and 'Rex' / S. Radice, O.H. Caso // *Sci Hort.* – 1990. – Vol. 41. – P. 343-347.

Ramanayake, S. *In vitro* shoot proliferation and enhancement of rooting for the large-scale propagation of yellow bamboo (*Bambusa vulgaris* 'Striata') / S. Ramanayake, V. Meemaduma, T. Weerawardene // *Scientia Horticulturae.* – 2006. – Vol. 110. – P. 109-113.

Ranyaphia, R.A. Direct organogenesis from leaf and internode explants of in vitro raised wintergreen plant (*Gaultheria fragrantissima*) / R.A. Ranyaphia, A.A. Maoa, S.K. Borthakur // *Sci. Asia.* – 2011. – Vol. 37. – P. 186-194.

Rey, M.D. Direct organogenesis of rice (*Oryza sativa* L.) mesocotyles / M.D. Rey, D.S. de Pinho, A.P. Vieira, E.J.B. Braga, C.R. Pierobom, J.A. Peters // *Acta Scientiarum-Agronomy.* – 2010. – Vol. 32. – P. 521-526.

Rocha, D.I. Alternative induction of de novo shoot organogenesis or somatic embryogenesis from in vitro cultures of mature zygotic embryos of passion fruit

(*Passiflora edulis* Sims) is modulated by the ratio between auxin and cytokinin in the medium / D.I.Rocha, C.C.Monte-Bello, M.C. Dornelas // *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. – 2015. – Vol. 120. – P. 1087-1098.

Rosu, A. In search of plant sources for serine protease inhibitors: I. Detection of serine protease inhibitors in callus cultures induced from somatic explants of flax (*Linum usitatissimum* L.) / A. Rosu, M.C. Eremia, M. Spiridon, S. Guidea, I. Lupescu, S. Jurcoane // *Roumanian Biotechnol. Lett.* – 2010. – Vol. 15. – P. 5668-5674.

Russell, J.A. Thidiazuron-stimulated shoot differentiation from protoplast-derived calli of *Populus* / J.A. Russell, B.H. McCown // *V1 International Congress on Plant Tissue and Cell Culture abstracts*. – 1986. – P. 49.

Sablowski, R. Plant and animal stem cells: Conceptually similar, molecularly distinct? / R. Sablowski // *Trends Cell Biol.* – 2004. – Vol. 14. – P. 605-611.

Samyn, G. Adventitious shoot regeneration and appearance of sports in several azalea cultivars / G. Samyn, S. De Schepper, E. Van Bockstaele // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 2002. – Vol. 70. – P. 223-227.

Skoog, F. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures in vitro / F. Skoog, C.O. Miller // *Symp. Soc. Exp. Biol.* – 1957. – Vol. 11. – P. 118-131.

Shaik, N. Improved method of in vitro regeneration in *Leucaena leucocephala* – a leguminous pulpwood tree species' / N Shaik, M. Arha, A Noo-karaju // *Physiology and Molecular Biology of Plants*. – 2009. – Vol. 15. – P. 311-318.

Shevade, A. In vitro shoot and floral organogenesis from stamen explants from *Rhododendron* PJM group clone / A. Shevade, J.E. Preece // *Sci. Hort.* – 1993. – Vol. 56. – P. 163–170.

Sicuranza, J. The production of in vitro callus, shoot and rooted plantlets of *Rhododendron catawbiense* variety 'English Roseum' from florets / J. Sicuranza, N.A. Mitkowski // *HortScience*. – 2007. – Vol. 42. – P. 410-412.

Singh, S.K. The influence of temperature, light and pre-treatment on the seed germination of critically endangered Sikkim Himalayan *Rhododendron* (*R. niveum*

Hook f.) / S.K. Singh, B. Gurung, L.K. Rai, L.H. Nepal // Journal of American Science. – 2010. – Vol. 6. – P. 172-177.

Sreenivasu, K. Plant regeneration via somatic embryogenesis in pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) / K. Sreenivasu, S.K. Malik, K.P. Ananda, R.P. Sharma // Plant Cell Rep. – 1998. – Vol. 17. – P. 294-297.

SUCN Plant Red Data book – UK. : Unwin. Bros. Ltd., 1978. – 540 p.

Svetla, D.Y. Auxin type and timing of application determine the activation of the developmental program during in vitro organogenesis in apple / D.Y. Svetla, G. Sara, F. Ervin, L.Y. Simcha, A.F. Moshe // Plant Sci. – 2003. – Vol. 165. – P. 299-309.

Thomas, T.D. Thidiazuron-induced high-frequency shoot organogenesis from leaf-derived callus of a medicinal climber, *Tylophora indica* (Burm. F.) Merrill / T.D. Thomas, B. Philip // In Vitro Cell Dev. Bio.Plant. – 2005. – Vol. 41. – P. 124-128.

Tiwari, O.N. Rhododendron conservation in Sikkim Himalaya / O.N. Tiwari, U.K. Chauhan // Current Sci. – 2006. – Vol. 90. – P. 532-541.

Tomsone, S. In vitro shoot regeneration from flower and leaf explants in *Rhododendron* / S. Tomsone, D. Gertnere // Biol. Plant. – 2003. – Vol. 46. – P. 463-465.

Tomsone, S. The influence of thidiazuron on shoot regeneration and proliferation of rhododendrons in vitro / S. Tomsone, D. Gertnere, D. Novikova // Acta Universitatis Latviensis ser. Biology. – 2004. – Vol. 676. – P. 239-242.

Trigiano, R. N. Plant Development and Biotechnology / R.N. Trigiano, D.J. Gray. – Boca Raton: CRC Press, 2005. – 357 p.

Trigiano, R.N. Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises / R.N. Trigiano, D.J. Gray. – Boca Raton: CRC Press LLC, 2000. – 358 p.

Van Veen, T. Rhododendron in America / T. Van Veen. – Portland: Sweeney Krist Dimm, 1969. – 176 p.

Vejsadová, H. Somatic embryogenesis in *Rhododendron catawbiense* Grandiflorum / H. Vejsadová, A. Petrova // Acta Hort. – 2003. – Vol. 616. – P. 467-470.

Vejsadová, H. Growth regulator effect on in vitro regeneration of rhododendron cultivars / H. Vejsadová // Hort. Sci. – 2008. – Vol. 35. – P. 90-94.

Verdeil, J.L. Pluripotent versus totipotent plant stem cells: dependence versus autonomy? / J.L. Verdeil, L. Alemanno, N. Niemenak, T.J. Trambarger // Trends in Plant Science. – 2007. – Vol. 12, No. 6. – P. 245-252.

Victor, J.M.R. Somatic embryogenesis and organogenesis in peanut: The role of thidiazuron and N-6-benzylaminopurine in the induction of plant morphogenesis / J.M.R. Victor, S.J. Murch, S. KrishnaRaj, P.K. Saxena // Plant Growth Regul. – 1999. – Vol. 28. – P. 9-15.

Wamaitha, M.J. Thidiazuron-induced rapid shoot regeneration via embryo-like structure formation from shoot tip-derived callus culture of sugarcane / M.J. Wamaitha, K. Suwa, K. Fukuda, M. Mii, H. Daimon, K. Mishiba // Plant Biotechnol. – 2010. – Vol. 27. – P. 365-368.

Wang, S.Y. Breaking bud dormancy in apple with a plant bioregulator, thidiazuron / S.Y. Wang, G.L. Steffens, M. Faust // Phytochemistry. – 1986. – Vol. 25. – P. 311-317.

Weigel, D. Stem cells that make stems / D. Weigel, G. Jürgens, // Nature. – 2002. Vol. 415. – P. 751-754.

Williams, L.W. Stem cell regulation in the Arabidopsis shoot apical meristem / L.W. Williams, J. C. Fletcher // Current Opinion in Plant Biology. – 2005. – Vol. 8. – P. 582-586.

Wondyifraw, T. Synergistic effects of some plant growth regulators on in vitro shoot proliferation of korarima (*Aframomum corrorima* (Braun) Jansen) / T. Wondyifraw, S. Wannakraioj // African Journal of Biotechnology. – Vol. 5. – P. 1894-1901.

Woo, S.M. An efficient tissue culture regeneration system for Georgia plume, *Elliottia racemosa*, a threatened Georgia endemic / S.M. Woo, H.Y. Wetzstein // HortScience. – 2008a. – Vol. 43. – P. 447-453.

Woo, S.M. Morphological and histological evaluations of in vitro regen-

eration in *Elliottia racemosa* leaf explants induced on media with thidiazuron / S.M. Woo, H.Y. Wetzstein // J. Amer. Soc. Hort. Sci. – 2008b. – Vol. 133. – P. 167-172.

Yan, H. *In vitro* and *ex vitro* rooting of *Siratia grosvenorii*, a traditional medicinal plant / H. Yan, C. Liang, L. Yang, Y. Li // Acta Physiol. Plant. – 2010. – Vol. 32. – P. 115-120.

Yancheva, S.D. Auxin type and timing of application determine the activation of the developmental program during *in vitro* organogenesis in apple / S.D. Yancheva, S. Golubowicz, E. Fisher, S. Lev-Yadun, M.A. Flaishman // Plant Sci. – 2003. – Vol. 165. – P. 299-309.

Yusnita, S. Micropropagation of white flowering eastern redbud (*Cercis canadensis* var. *alba* L.) / S. Yusnita // J. Environ. Hort. – 1990. – Vol. 8. – P. 177-179.

Zhang, C.G. Endogenous Hormonal levels in *scutellaria baicalensis* calli induced by thidiazuron / C.G. Zhang, W. Li, Y.F. Mao, D.L. Zhao, W. Dong, G.Q. Guo // Russ. J. Plant Physiol. – 2005. – Vol. 52. – P. 345-351.

Zuker, A. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of *Gypsophila paniculata* L. / A. Zuker, A. Ahroni, H. Shejtman, A. Vainstein // Plant Cell Reports. – 1997. – Vol. 16. – P. 775-778.

ПРИЛОЖЕНИЯ

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Протоколы клонального микроразмножения *R. dauricum*

Тип экспланта	Этапы микроразмножения	Описание	Продолжительность
Семена	<ol style="list-style-type: none"> 1. Стерилизация 2. Получение асептической культуры проростков 3. Собственно микроразмножение 4. Укоренение и адаптация 	<ol style="list-style-type: none"> 1) 70 % спирт; 2) 20 % «Доместос» (0,2 % гипохлорит натрия) <p>проращивание асептических семян на 0,6 % агаре</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) инокуляция проростков на АМ + 2,5 мкМ зеатина или АМ + 1,0 мкМ ТДЗ; 2) элонгация побегов на АМО 1) индукция ризогенеза: импульсная обработка регенерантов ($h \geq 1$ см) в растворе 148,0 мкМ ИМК; 2) высадка микропобегов в смесь торфа (рН = 4,0-5,0) и песка в соотношении 1:1 	<p>2 мин 20 мин</p> <p>около 3 недель</p> <p>6–8 недель</p> <p>6 недель</p> <p>4 часа</p> <p>6–8 недель</p>
Флоральные экспланты (пестик с цветоножкой)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Стерилизация 2. Собственно микроразмножение 3. Укоренение и адаптация 	<ol style="list-style-type: none"> 1) 70 % спирт; 2) 20 % Доместос (0,2% гипохлорит натрия); 3) 0,1% AgNO₃ 1) пред культивирование на АМО; 2) регенерация на АМ + 1,0 мкМ ТДЗ + 2,5 мкМ зеатина; 3) элонгация на АМО 1) индукция ризогенеза: импульсная обработка регенерантов ($h \geq 1$ см) в растворе 148,0 мкМ ИМК; 2) высадка микропобегов в смесь торфа (рН = 4,0-5,0) и песка в соотношении 1:1 	<p>2 мин 15 мин 15 мин</p> <p>4 дня 8 недель</p> <p>6 недель</p> <p>4 часа</p> <p>6–8 недель</p>

Протоколы клонального микроразмножения *R. sichotense*

Тип экспланта	Этапы микроразмножения	Описание	Продолжительность
Листовые экспланты (листовая пластина с черешком из культуры <i>in vitro</i>)	1. Собственно микроразмножение	1) регенерация на АМ + 1,0 мкМ ТДЗ; 2) элонгация побегов на АМО	15 недель 8 недель
	2. Укоренение и адаптация	1) индукция ризогенеза: импульсная обработка регенерантов ($h \geq 1$ см) в растворе 148,0 мкМ ИМК; 2) высадка микропобегов в смесь торфа ($pH = 4,0-5,0$) и песка в соотношении 1:1	4 часа 6–8 недель
Флоральные экспланты (пестик с цветоножкой)	1. Стерилизация	1) 70% спирт; 2) 20% «Доместос» (0,2% гипохлорит натрия); 3) 0,1% $AgNO_3$	2 мин. 15 мин. 15 мин.
	2. Собственно микроразмножение	1) предкультивирование на АМО; 2) регенерация на АМ + 1,0 мкМ ТДЗ; 3) элонгация на АМО	4 дня 8 недель 6 недель
	3. Укоренение и адаптация	1) индукция ризогенеза: импульсная обработка регенерантов ($h \geq 1$ см) в растворе 148,0 мкМ ИМК; 2) высадка микропобегов в смесь торфа ($pH = 4,0-5,0$) и песка в соотношении 1:1	4 часа 6–8 недель

Протокол клонального микроразмножения *R. schirrenbachii*

Тип экспланта	Этапы микроразмножения	Описание	Продолжительность
Семена	<ol style="list-style-type: none"> 1. Стерилизация 2. Получение асептической культуры проростков 3. Собственно микроразмножение 4. Укоренение и адаптация 	<ol style="list-style-type: none"> 1) 70 % спирт; 2) 20 % «Доместос» (0,2 % гипохлорит натрия) <p>проращивание асептических семян на 0,6 % агаре</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) инокуляция проростков на АМ + 2,5 мкМ зеатина или АМ + 1,0 мкМ ТДЗ; 2) элонгация побегов на АМО <ol style="list-style-type: none"> 1) индукция ризогенеза: импульсная обработка регенерантов ($h \geq 1$ см) в растворе 148,0 мкМ ИМК; 2) высадка микропобегов в смесь торфа (рН = 4,0-5,0) и песка в соотношении 1:1 	<p>2 мин 20 мин</p> <p>около 3 недель</p> <p>6–8 недель</p> <p>6 недель</p> <p>4 часа</p> <p>6–8 недель</p>

ПРИЛОЖЕНИЕ 4

Протокол клонального микроразмножения *R. catawbiense* «Grandiflorum»

Тип экспланта	Этапы микроразмножения	Описание	Продолжительность
Листовые экспланты (листовая пластина с черешком из культуры <i>in vitro</i>)	<p>1. Собственно микроразмножение</p> <p>2. Укоренение и адаптация</p>	<p>1) регенерация на AM + 0,5 мкМ ТДЗ или на AM0 после импульсной обработки 30 мкМ ТДЗ;</p> <p>2) элонгация побегов на AM0</p> <p>1) индукция ризогенеза: импульсная обработка регенерантов ($h \geq 1$ см) в растворе 148,0 мкМ ИМК;</p> <p>2) высадка микропобегов в смесь торфа (pH = 4,0-5,0) и песка в соотношении 1:1</p>	<p>15 недель</p> <p>6–8 недель</p> <p>4 часа</p> <p>6–8 недель</p>