

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Satbayev University

Институт химических и биологических технологий

Кафедра Химической и Биохимической Инженерии

Ахметова Д. М.

Получение растений-регенерантов роз из изолированных зародышей в условиях *in vitro*

**МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

6M070100 – Специальность «Биотехнология»

Алматы 2020

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет  
имени К.И.Сатпаева

Институт Химических и Биологических Технологий

Ахметова Диана Мубараккызы

(Ф.И.О. обучающегося)

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

На соискание академической степени магистра

Название диссертации            «Получение растений-регенерантов роз из изолированных  
зародышей в условиях *in vitro*».

Направление подготовки        6М070100 – Биотехнология

Научный руководитель  
к.б.н., ассоц. профессор



подпись

Малахова Н. П.

«\_30\_»\_\_июня\_\_ 2020 г.

ДОПУЩЕН К ЗАЩИТЕ

Заведующий кафедрой

«Химическая            и            Биохимическая  
Инженерия»

\_\_\_\_\_ Рафикова Х.С.  
подпись

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.

Алматы 2020

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет

имени К.И. Сатпаева

Институт Химических и Биологических Технологий

Кафедра Химической и Биохимической Инженерии

6M070100 – «Биотехнология»

**УТВЕРЖДАЮ**

Заведующий кафедрой

«Химическая и Биохимическая Инженерия»

Рафикова Х.С.

\_\_\_\_\_

подпись

«\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г.

**ЗАДАНИЕ**

**на выполнение магистерской диссертации**

Обучающейся *Ахметовой Диане Мубараккызы*

Тема *Получение растений-регенерантов роз из изолированных зародышей в условиях in vitro*

Утверждена приказом Ректора Университета *2018г «31» октября № 1226-м*

Срок сдачи законченной работы *«01» июля 2020 г.*

Исходные данные к диссертационной работе: *Исследования проведены на базе лаборатории биоинженерии растений РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина» КН МОН РК.*

Перечень подлежащих разработке в дипломной работе вопросов:

а) подбор исходного растительного материала для введения изолированных зародышей в условия in vitro

б) отбор эффективных способов стерилизации эксплантов

в) оптимизация состава питательной среды для инициации роста микроробегов роз

г) подбор наиболее эффективных условий культивирования для получения жизнеспособных растений-регенерантов

д) изучить регенерационные способности эмбрионов роз на начальном этапе введения в культуру in vitro;

е) получение регенерантов, готовых к культивированию в условиях ex-vitro

Перечень графического материала: *представлены 13 слайдов презентации работы*

Рекомендуемая основная литература *состоит из 49 наименований*


## ГРАФИК

подготовки магистерской диссертации

Наименование разделов, перечень разрабатываемых вопросов	Сроки представления научному руководителю	Примечание
Микроклональное размножение	10.10.2019	
Биологические особенности сортов роз	20.10.2019	
Подбор оптимальных условий стерилизации эксплантов	25.10.2019	
Подбор оптимальных питательных сред	09.01.2020	
Особенности культивирования в условиях <i>in vitro</i>	05.03.2020	
Адаптация	20.05.2020	

## Подписи

консультантов и нормоконтролера на законченную магистерскую диссертацию с указанием относящихся к ним разделов диссертации

Наименования разделов	Консультанты, И.О.Ф. (уч. степень, звание)	Дата подписания	Подпись
Нормоконтролер	к.б.н., ассоц. профессор Малахова Н. П.	30.06.20	

Научный руководитель

  
(подпись)

Малахова Н. П.

Задание принял к исполнению обучающийся

  
(подпись)

Ахметова Д. М.

Дата

" 30 " июня 2020 г.

## АННОТАЦИЯ

Диссертационная работа состоит из 63 страниц, 15 рисунков, 4 таблиц, 49 использованных источника литературы.

*Цель исследований:* введение изолированных зародышей роз культуру *in vitro* для получения растений-регенерантов.

*Задачи исследований:*

1. Выбрать исходный растительный материал для введения в условия *in vitro*;

2. Подбор эффективных способов стерилизации исходного материала;

3. Оптимизация состава питательной среды для инициации роста микропобегов роз 2 сортов голландской селекции;

4. Подбор наиболее эффективных условий культивирования для получения жизнеспособных растений-регенерантов;

5. Изучить регенерационные способности изолированных зародышей роз на начальном этапе введения в культуру *in vitro*;

*Результаты исследования:*

1. Выбран исходный растительный материал изолированных зародышей 2 сортов роз для введения в условия *in vitro*;

2. Проведен подбор эффективных способов стерилизации бутонов;

3. Проведен подбор наиболее оптимальной питательной среды для инициации роста микропобегов роз 2 сортов голландской селекции;

4. Изучены регенерационные способности изолированных зародышей роз на начальном этапе введения в культуру *in vitro*;

5. Оптимизированы наиболее эффективные условия культивирования в *in vitro* для получения жизнеспособных растений-регенерантов пионовидных роз.

В данной работе были подобраны оптимальные условия для образования растений-регенерантов из изолированных зародышей исследуемых сортов роз. Результаты эксперимента показали, что наличие кинетина не оказывает достоверного влияния на регенерацию, что подтверждает ключевую роль ауксина 2,4-Д в процессе культивирования эмбрионов *in vitro*.

*Практическое использование:* полученные в данной работе результаты могут быть основой для проведения дальнейших работ по микрклональному размножению посадочного материала роз ценных сортов, а также, в дальнейшем, могут быть использованы в «зеленом строительстве» региона, для выполнения работ по практической селекции, разработке более совершенных методов селекции в условиях *in vitro*.

*Научная новизна:*

Новизна работы заключается в применении эффективных методов биотехнологии, направленных на создание отечественной *in vitro* коллекции сортов роз голландской селекции для дальнейших исследований

и оптимизации методов для получения качественного, адаптированного к условиям нашей страны, оздоровленного и воспроизводимого посадочного материала декоративных сортов, широко используемых в современном ландшафтном дизайне.

Известно, что повысить эффективность селекционной работы можно с помощью метода изолированных эмбрионов *in vitro*. Исходя из комплекса эмбриологических и детальных цитофизиологических исследований, общепризнано, что основным условием формирования морфогенного каллуса является использование в качестве экспланта изолированных зародышей, которые характеризуются определенным цитогистологическим статусом эмбриона. Были выявлены и изучены пути морфогенеза в культуре каллуса *in vitro* незрелых зародышей роз и показана универсальность начального этапа всех путей морфогенеза *in vitro*. Кроме того, уже охарактеризованы цитофизиологические особенности развития морфогенетического очага для каждого из выявленных путей морфогенеза *in vitro*. Метод изолированных зародышей используется не только для длительной гибридизации, но и для преодоления постгамной несовместимости, а также в целях микроразмножения ценных гибридов. В этом случае микроповреждение происходит с образованием каллуса, индукцией морфогенеза и продуцированием регенеративных растений из ткани каллуса. Методика клонирования незрелых зародышей позволяет воспроизводить ценный растительный генотип на ранних стадиях жизненного цикла. Еще одним вариантом использования зародышевой культуры является ее использование при отборе клеток.

Таким образом, в данном исследовании впервые проведен подбор условий стерилизации растительных эксплантов, определен уникальный состав питательной среды и условий для введения и культивирования незрелых зародышей двух сортов роз *Red Piano* и *Floribunda Pomponella* в культуру *in vitro*, для получения жизнеспособных растений-регенерантов.

*Структура и объем.* Диссертационная работа оформлена в цифровом формате на 63 страницах компьютерного текста. По содержанию магистерская диссертация содержит введение (2 стр.), обзор литературы (20 стр.), материал и методику исследования (3 стр.), результаты исследования (15 стр.) и заключение (2 стр.). Диссертация содержит 15 рисунков, 4 таблиц.

## АНДАТПА

Дипломдық жұмыс 63 беттен тұрады, 15 сурет, 4 кесте, 49 пайдаланылған әдебиет тізімінен тұрады.

*Зерттеудің мақсаты:* өсімдік-регенеранттарды алу үшін *in vitro* өсірілген раушан ұрықтарын енгізу.

*Зерттеу міндеттері:*

1. *In vitro* өсімдікті өсіру үшін бастапқы материалды енгізу
2. Таңдау тиімді тәсілдерінің эксплантты стерильдеу
3. Құрамын оңтайландыру үшін қоректендіру ортасын бастамашылық жасау өсу микропобегов раушан
4. Зерделеп, регенерациялық қабілеті бастапқы эксплантов раушан бастапқы кезеңінде енгізілу мәдениеті *in vitro*;
5. *In vitro* мәдениетіне енгізудің бастапқы кезеңінде оқшауланған раушан эмбриондарының регенерациялық қабілетін зерттеу;

*Зерттеу нәтижелері:*

1. Іріктеу бастапқы өсімдік материал 2 раушан сорттарын енгізу үшін жағдайлар *in vitro*;
2. Атты таңдау тиімді тәсілдерінің стерильдеу эксплантов;
3. Атты таңдау оңтайлы қоректік орта үшін бастамашылық жасау өсу микропобегов раушан 2 сортты ;
4. *In vitro* мәдениетіне енгізудің бастапқы кезеңінде оқшауланған раушан эмбриондарының регенерациялық қабілеті зерттелді.
5. Өміршең өсімдіктер-пион тәрізді раушан регенеранттарын алу үшін *in vitro*-да өсірудің ең тиімді шарттары оңтайландырылды.

Бұл жұмыста зерттелетін раушан сорттарының оқшауланған ұрықтарынан өсімдік-регенеранттардың түзілуі үшін оңтайлы жағдайлар таңдалды. Эксперимент нәтижелері кинетиннің болуы регенерацияға шынайы әсер етпейтінін көрсетті, бұл *in vitro* эмбриондарын өсіру процесінде 2,4-Д ауксиннің негізгі рөлін растайды.

*Қолдану:* алынған нәтижелер лечь в основу жүргізу жөніндегі жұмыстарды одан әрі микроклональдық көбейту, отырғызу материалын раушан бағалы сорттарын голланд және жергілікті селекция, сондай-ақ, одан әрі пайдаланылуы мүмкін "жасыл құрылысқа" өңір бойынша жұмыстарды орындау үшін практикалық селекция әзірлеу, неғұрлым жетілдірілген әдістерін селекция *in vitro* жағдайында.

*Ғылыми жаңалығы:* дипломлық жұмыстың жаңалығы болып табылады қолдану тиімді биотехнология әдістерін құруға бағытталған отандық *in vitro* коллекциясында раушан сорттарын голланд және жергілікті селекция үшін одан әрі зерттеу және оңтайландыру әдістерін алу үшін сапалы бейімделген шарттары еліміздің емделген және қосылатын отырғызылатын материалдың сәндік сорттарын, кеңінен қолданылатын қазіргі ландшафтты дизайндағы.

Селекциялық жұмыстың тиімділігін *in vitro* оқшауланған эмбриондар әдісі арқылы арттыруға болады. Эмбриологиялық және егжей-тегжейлі

цитофизиологиялық зерттеулер кешенін негізге ала отырып, морфогенді каллустың қалыптасуының негізгі шарты эмбрионның белгілі цитогистологиялық мәртебесімен сипатталатын оқшауланған эмбриондарды эксплант ретінде пайдалану болып табылады. Морфогенездің барлық жолдарының бастапқы кезеңінің эмбебаптығы *in vitro* каллус мәдениетінде анықталды және зерттелді. Сонымен қатар, *in vitro* морфогенезінің әрбір анықталған жолдары үшін морфогенетикалық ошақтың дамуының цитофизиологиялық ерекшеліктері сипатталған. Оқшауланған ұрықтар әдісі тек ұзақ Гибридизация үшін ғана емес, сонымен қатар пергамен үйлесімсіздікті жеңу үшін, сондай-ақ бағалы гибридтерді микро көбейту мақсатында қолданылады. Бұл жағдайда микро зақымдану каллус, морфогенез индукциясы және каллус тінінен регенеративті өсімдіктерді өндіреді. Жетілмеген ұрықтарды клондау әдістемесі құнды өсімдік генотипін өмірлік циклдің ерте кезеңдерінде жаңғыртуға мүмкіндік береді. Эмбрион дақылдарын пайдаланудың тағы бір нұсқасы-оны жасушаларды іріктеу кезінде пайдалану.

Осылайша, осы зерттеуде алғаш рет өсімдік экспланттарын стерилизациялау шарттарын таңдау жүргізілді, *Red Piano* және флорибунд *Pomponella* раушан гүлдерінің екі сортының жетілмеген ұрықтарын *in vitro* мәдениетіне енгізу және өсіру үшін қоректік ортаның және жағдайлардың бірегей құрамы анықталды, өміршең өсімдіктер-регенеранттарды алу үшін.

*Құрылымы мен көлемі.* Диссертациялық жұмыс компьютерлік мәтіннің 63 беттерінде цифрлық форматта ресімделген. Мазмұны бойынша магистрлік диссертацияда кіріспе (2 бет), әдебиетке шолу (20 бет), зерттеу материалы мен әдістемесі (3 бет), зерттеу нәтижелері (15 бет) және қорытынды (2 бет) бар. Диссертацияда 15 сурет, 4 кесте бар.



## ANNOTATION

The diploma project consists of 63 pages, 15 figures, 4 tables, 49 used literature sources.

*Purpose of researches:* introduction of isolated rose germ culture *in vitro* to obtain regenerating plants

*Research problems:*

1. Select initial plant material for introduction to *in vitro* conditions
2. Selection of effective ways of sterilization of eksplant
3. Optimization of composition of nutrient medium for initiation of growth of micro sprouts of roses
4. Study regeneration abilities of primary eksplant of roses at the initial stage of introduction to the culture of *in vitro*;
5. To study the regenerative abilities of isolated rose germs at the initial stage of introduction into culture *in vitro*.

*Results of a research:*

1. Selection initial plant material 2 grades of roses for introduction to *in vitro* conditions are made;
2. Selection of effective ways of sterilization of eksplant is carried out;
3. Selection of the most optimum nutrient medium for initiation of growth of micro sprouts of roses 2 grades is carried out;
4. The regenerative abilities of isolated rose germs at the initial stage of introduction into culture *in vitro* were studied;
5. The most effective conditions of *in vitro* cultivation for obtaining viable plants-regenerants of peony roses are optimized.

In this work, optimal conditions were selected for the formation of regenerating plants from isolated embryos of the studied rose varieties. The results of the experiment showed that the presence of kinetin does not have a significant effect on regeneration, which confirms the key role of auxin 2,4-D in the process of embryo culture *in vitro*.

*Practical use:* the received results can form the basis of carrying out further works on micro channels reproduction of landing material of roses of valuable grades of the Dutch and local selection, and also, further, can be used in "green construction" of the region, for performance of work on practical selection, development of more perfect methods of selection in the conditions of *in vitro*.

*Scientific novelty:* the innovation of work consists in application of the effective methods of biotechnology directed to creation of domestic *in vitro* of a collection of grades of roses of the Dutch and local selection for further researches and optimization of methods for receiving qualitative, adapted to conditions of our country, revitalized and the reproduced landing material of the decorative grades which are widely used in modern landscaping.

It is known that it is possible to increase the efficiency of selection work using the method of isolated embryos *in vitro*. Based on the complex of embryological and detailed cytophysiological studies, it is generally recognized

that the main condition for the formation of morphogenic callus is the use of isolated embryos as explants, which are characterized by a certain cytohistological status of the embryo. The pathways of morphogenesis in the culture of callus *in vitro* of immature rose embryos were identified and studied, and the universality of the initial stage of all pathways of morphogenesis *in vitro* was shown. In addition, the cytophysiological features of the morphogenetic focus development for each of the identified pathways of morphogenesis *in vitro* have already been characterized. The method of isolated embryos is used not only for long-term hybridization, but also to overcome postgamous incompatibility, as well as for the purpose of micro-propagation of valuable hybrids. In this case, micro-damage occurs with the formation of callus, the induction of morphogenesis, and the production of regenerative plants from the callus tissue. The technique of cloning immature embryos allows you to reproduce a valuable plant genotype at the early stages of the life cycle. Another option is the use of embryo culture is its use in the selection of cells.

Thus, this study is the first conducted selection sterilization of plant explants, determined by the unique composition of the nutrient medium and conditions for the introduction and cultivation of immature embryos of two varieties of *Red Piano* roses and *Floribunda Pomponella* in culture *in vitro* to obtain viable regenerated plants.

*Structure and volume.* The dissertation work is presented in digital format on 63 pages of computer text. In terms of content, the master's thesis contains an introduction (2 pages), a literature review (20 pages), research material and methodology (3 pages), research results (15 pages) and conclusion (2 pages). Thesis contains 15 figures, 4 tables.

## СОДЕРЖАНИЕ

	Введение	12
1	Литературный обзор	13
1.1	Выбор направления исследования	13
1.2	Микроклональное размножение	15
1.3	Этапы микроклонального размножения	18
1.4	Классификация методов микроклонального размножения	19
1.5	Развитие исследований по клональному микроразмножению <i>in vitro</i>	20
1.6	Культура изолированных органов и тканей <i>in vitro</i>	21
1.7	Биологические особенности сортов роз	32
2	Методы и объекты исследования	35
2.1	Материалы исследований	35
2.2	Методы исследования	35
	2.2.1 Стерилизация растительного материала	35
	2.2.2 Получение каллусной культуры роз путем надреза зародыша.	36
	2.2.3 Клональное микроразмножение	36
	2.2.4 Адаптация	36
3	Результаты экспериментальных исследований	37
3.1	Подбор оптимальных условий стерилизации растительного материала	39
3.2	Подбор оптимального состава питательной среды	45
3.3	Адаптация растений-регенерантов	50
	Заключение	52
	Список использованной литературы	56

## ВВЕДЕНИЕ

*Актуальность.* Одним из важных вопросов современности является сохранение и увеличение биоразнообразия, в том числе фиторазнообразия, для чего используются различные направления биологической науки: ботаника, генетика, селекция, интродукция, биотехнология и т.д. Наиболее приоритетным направлением в данном вопросе является биотехнология благодаря ряду существенных преимуществ: биотехнологические процессы обладают низкой энергоемкостью, почти безотходны, экологически чистые, исследования проводятся круглый год, культивируемые растения занимают при этом незначительные площади. В биотехнологии использование метода культуры клеток, органов и тканей растений имеет как фундаментальное, так и прикладное значение и в последние годы активно применяется в разных областях хозяйственной деятельности человека для получения веществ вторичного синтеза, ускоренного размножения культур, трудноразмножаемых традиционными методами, оздоровления растительного посадочного материала, использования в генетико-селекционной работе и создания генбанков *in vitro* [1-11].

Современные технологии микроразмножения в большинстве случаев являются более рентабельными по сравнению с традиционными способами вегетативного или семенного размножения, и если они реализуются непрерывно в годичном цикле, могут обеспечить быстрое воспроизводство больших партий высококачественного посадочного материала.

*Цель и задачи исследований:* введение изолированных зародышей роз в культуру *in vitro* для получения растений-регенерантов.

Из поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Выбрать исходный растительный материал двух сортов роз голландской селекции для введения в условия *in vitro*;
2. Подбор эффективных способов стерилизации эксплантов;
3. Оптимизация состава питательной среды для введения в культуру *in vitro* незрелых зародышей роз;
4. Подбор наиболее эффективных условий культивирования для получения жизнеспособных растений-регенерантов;
5. Изучить регенерационные способности изолированных зародышей роз на начальном этапе;
6. Получить жизнеспособные растения-регенеранты пионовидных сортов роз.

*Апробация работы.* Основные положения и результаты исследовательской работы в виде двух тезисов представлялись и обсуждались на Сатпаевских чтениях (Алматы, 2020), а также в международной научной конференции «ФАРАБИ ЭЛЕМІ» [48-49].

# 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

## 1.1 Выбор направления исследования

Представленные в работе сорта роз имеют большое значение в популяции роз. Несмотря на существующее разнообразие декоративных сортов роз в практической и производственной деятельности издавна используются формы розы, имеющие высокую пищевую и сырьевую ценность для фармацевтической промышленности. Селекционный процесс позволил создать сорта роз, отличающиеся урожайностью, содержанием питательных веществ и витаминов, размером и массой плодов [1].

Одной из культур, пользующейся большой популярностью в нашей стране и за рубежом, является роза.

Изучение биологических особенностей и декоративных качеств роз, выращиваемых в защищённом грунте, достаточно широко представлены в отечественных и зарубежных научных публикациях

В настоящее время необходимость данного исследования вызвана тем, что в Казахстан импортируется большой объём срезочной продукции роз, диктуемый определенной модой, а также посадочный материал, часто не соответствующий почвенно-климатическим условиям, в которых его планируют выращивать.

Изучение биологических особенностей этой культуры даёт возможность подобрать ассортимент роз, как для теплиц разной оснащённости, так и для различных способов ведения культуры, подобрать оптимальные способы формирования растений под определённые режимы выгонки. Данное исследование позволяет раскрыть потенциальные возможности пионовидных сортов роз в новых почвенно-климатических условиях. Это также обуславливает необходимость и актуальность проведения нашего исследования.

Известно, что многие сорта роз при размножении семенами теряют свои свойства и урожайность [2]. В связи с этим, как для роз, так и для других плодовых культур важна способность растения к вегетативному размножению.

Есть множество способов вегетативного размножения роз, но как показала практика и научные изыскания в области их размножения, наиболее выгодными, технологичными и продуктивными являются три способа:

1) размножение прививкой - применяют в промышленном производстве саженцев роз, черенкование полуодревесневшими черенками и размножение зелёными черенками [2-3]. До недавнего времени промышленное размножение проводилось при помощи прививки;

2) способом корнесобственной культуры - большое количество исследователей признают преимущество этого метода [2]. Он является экономически выгодным, поскольку время выращивания стандартных

привитых саженцев составляет минимально 3 года, в то время как на получение стандартного саженца корнесобственной розы требуется 1-2 года[3];

3) размножение роз черенками - этот способ является более продуктивным и выгодным. Он основан на получении корнесобственных растений методом зелёного черенкования.

Третий способ повышает укореняемость некоторых сортов роз до 87-97%, в сравнении с укоренением одревесневшими и полуодревесневших черенками, который для эфиромасличных роз достигал только 30-35% [2-3]. Однако, метод зеленого черенкования имеет и недостатки - черенкование роз всегда связано с образованием ран с большой площадью поверхности и массой каллусной ткани, которые часто служат воротами для инфекций [4];

Все три перечисленных метода, принятых в промышленном производстве, служат способом передачи опасных вирусных и микоплазменных заболеваний. По данным, предоставленных в разных источниках, растение роз может быть переносчиком около десятка различных вирусов [5]. Вирусы могут инфицировать и ряд других плодовых культур, что делает их более опасными [6]. Решение перечисленных проблем, связанных с методами традиционного вегетативного размножения в последнее время применяют методы клонального микроразмножения розы.

Главное преимущество техники микроклонального размножения, в том, что растения могут регенерировать отсутствующие части. Из отдельных частей образуется целое растение с характерными свойствами этого вида и непосредственно самого материнского растения. Таким образом, клонированием можно сохранять характерные черты растений длительное время [7].

Резюмируя главные преимущества вегетативного размножения растений можно заключить, что полученные этим способом организмы:

- по индивидуальному развитию на порядок выше, по этой причине зацветают быстро;
- однородны функционально-физиологически, а также генетически и анатомически;
- могут иметь возникшие неожиданные мутации;
- более выносливы;
- обладают способностью к самовозобновлению;
- продуктивны и долговечны;
- не имеют различных заболеваний, в том числе, вирусных [8].

## 1.2 Микрклональное размножение

Микроразмножение – это бесполое вегетативное размножение, при котором получают генетически идентичные формы, что способствует сохранению генетически однородного посадочного материала. С помощью клонального микроразмножения успешно преодолевается период покоя растений и их размножение в контролируемых условиях в течение всего года. Это способствует увеличению производительности труда и повышению его рентабельности.

В настоящее время существует несколько разных, подробно разработанных методов микрклонального размножения. Они отличаются состоянием исходных клеток и тканей, которые берутся для получения микрклонов. В одних случаях исходные клетки и ткани находятся в состоянии активного клеточного деления. В других - исходным материалом для получения микрклонов служат уже дифференцированные клетки. В первом случае меристематические, активно делящиеся клетки образуют каллус, проходят первичную дифференциацию, идет интенсивный гисто- и органогенез, формируются эмбриониды, почки и образуется микрклон (мери-клон). Во втором случае начинается процесс дедифференциации, затем протекают процессы всех этапов, указанных в первом случае. Наиболее важным требованием технологии микрклонального размножения является обеспечение полной стерильности и оптимальных условий для клеточного деления и дифференциации исходной ткани. Затем не менее важной задачей является необходимость добиться образования как можно большего количества микрклонов (мериклонов) и обеспечить их укоренение. Чтобы эффективность микрклонального размножения была высокой, необходимо на всех этапах выполнения этой биотехнологии поддерживать оптимальные условия выращивания. С этой целью для каждой культуры разрабатывается конкретная методика микрклонального размножения [7].

Существует несколько основных моделей клонального микроразмножения растений:

- индукция органогенеза или соматического эмбриогенеза, только после получения каллусной ткани;
- индукция развития побегов из ткани экспланта;
- пролиферация пазушных побегов [10].

Главными преимуществами микрклонального размножения является:

- получение посадочного материала;
- оздоровление растений вирусных, от микоплазменных и нематодных инфекций, а также грибных и бактериальных патогенов,
- высокий коэффициент размножения: при клональном микроразмножении можно получить 100 000-1 000 000 клонов в год, тогда как при обычном – всего 5-100 за тот же срок;
- короткое время прохождения селекционного процесса;

- размножение трудно размножаемых растений, которое невозможно получить традиционными способами;
- экономия необходимых площадей для выращивания посадочного материала.

Технологии размножения *in vitro*, можно разделить на мелкомасштабные и крупномасштабные. Это деление связано с областями и целями применения.

Клональное микроразмножение используют:

1. для скорого получения крупных количеств безвирусного материала;
2. для размножения и поддержания некоторого числа отдельных генотипов в селекции (не требует больших масштабов);
3. для быстрого размножения новых сортов;
4. для размножения и разведения древесных растений, селекция которых проходит медленно из-за длительности или отсутствия вегетативного размножения;
5. для поддержки гетерозигот, расщепляющихся при скрещивании растений;
6. для сохранения редких и исчезающих видов.

Первооткрывателем микроразмножения был французский ученый Жорж Морель. Он разработал этот метод для орхидей в 1960 году [9]. В СССР работы по микроразмножению была начата в 60-х годах в Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Были изучены условия микроразмножения сахарной свеклы, гвоздики, герберы, картофеля, фрезии и некоторых других растений, а также были предложены промышленные технологии микроразмножения, под руководством профессора Р.Г. Бутенко.

В Казахстане работы по биотехнологии впервые были начаты с 1975 года. Основателями биотехнологии в Казахстане являются академик М. А. Айтхожин, И. Р. Рахимбаев[11], которыми были проведены работы в области молекулярной биологии.

Существует несколько путей осуществления процесса микроразмножения предложенной Т. Murashige (1977):

- активация пазушных меристем;
- инициацией образования адвентивных побегов в каллусе;
- инициацией возникновения адвентивных побегов тканями экспланта;
- инициацией в клетках экспланта соматического эмбриогенеза;
- инициацией соматической эмбриогенеза в каллусной ткани;
- инициацией формирования в ткани первичных соматических зародышей придаточных эмбрионидов [12].





Рисунок 1 – Схема микроклонального размножения растений *in vitro* преимущества и недостатки [13].

Для большинства видов растений вегетативное размножение затруднено в силу нескольких причин, главными из которых являются:

- не все породы, могут размножаться вегетативным способом с требуемой эффективностью;
- невозможно с помощью черенкования размножить многие виды растений в возрасте старше 9- 15 лет;
- не всегда удастся получать нужный посадочный материал;
- сложность и трудоемкость операций при размножении растений с помощью прививок;
- неэффективность разработанных технологий для получения необходимого количества материала в течение года.

Новые открытия в области культуры клеток и тканей привело к созданию нового метода вегетативного размножения – микроклонального размножения. В основе метода лежит способность растительной клетки реализовывать присущую ей тотипотентность, т.е давать начало целому растению.

Немаловажным этапом в процессе микроклонального размножения растений *in vitro* является выращивание безвирусных маточных форм растений в изолированных боксах в зимних теплицах или вегетационных домиках, в условиях, которые недоступны для переносчиков вирусов. Растения-доноры эксплантов должны быть протестированы на наличие вирусных микоплазменных и бактериальных инфекций, для последующего введения в культуру *in vitro*, с помощью методов ПЦР-диагностики либо молекулярной гибридизации или иммуноферментного анализа (ИФА) [13-14].

### 1.3 Этапы микроклонального размножения растений

Клональное микроразмножение состоит из несколько этапов. Основными из них являются [13-16]:

1-й этап — введение экспланта из растения-донора в культуру *in vitro*;

2-й этап — собственно само микроклональное размножение;

3-й этап — укоренение побегов;

4-й этап — выход укорененных растений из стерильных условий в нестерильные, высаживание в почву.

Для культивирования тканей на каждом из этапов требуются питательные среды определенного состава.

На I этапе необходимо добиться получения стерильной культуры. В тех случаях, когда существуют сложности с получением стерильной клеточной культуры, в питательную среду вводят 90-210 мг/л антибиотиков. Особенно это касается древесных растений, склонных к накоплению внутренних инфекций [17].

В самом начале, в основном используют среду, содержащую минеральные соли по рецепту Мурасига и Скуга и симулятора роста (ауксины, цитокинины), а также БАВ в различных сочетаниях в зависимости от объекта.

II этап – собственно микроклональное размножение. На данном этапе необходимо добиться получения большего количества мериклонов, принимая во внимание то, что с увеличением субкультивирований повышается число растений-регенерантов с ненормальной морфологией, отклоняющейся от исходной, образование растений-мутантов.

Как и на начальном этапе, используют питательную среду по МС, содержащую различные биологически активные вещества, а также регуляторы роста. Важную роль при подборе оптимальных условий культивирования играют концентрация и соотношение цитокининов и ауксинов.

Преимущественно долгое культивирование растительных тканей на питательных средах с большим содержанием цитокининов приводит к постепенному накоплению их в тканях, что приводит к появлению токсического действия и формированию растений с измененной морфологией. Также можно заметить такие нежелательные для микроразмножения эффекты, как подавление пролиферации пазушных меристем, а также появление витрифицированных побегов и уменьшение способности к укоренению.

Отрицательное действие цитокининов можно преодолеть, по данным Н.В. Катаевой и Р.Г. Бутенко, а также через использование питательных сред с минимальной концентрацией цитокининов, а также возможно путем чередования циклов культивирования на средах с низким и высоким уровнем фитогормонов.

Следующие этапы: укоренение микропобегов и их последующая адаптация к почвенным условиям и высадка в поле, от которых зависит успех клонального микрокломножения.

На третьем этапе, укоренение микропобегов используют специфический состав питательной среды для укоренения [17].

Завершает процесс микрокломнольного размножения пересадка растений-регенерантов в почвенный субстрат и их последующая адаптация к почвенным условиям, высадка в поле. Наиболее благоприятным временем для пересадки растений, является весна или начало лета [18].

#### 1.4 Классификация методов микрокломнольного размножения

Были выделены два различных типа микрокломнольного размножения, такими учёными, как Р. Г. Бутенко и Н. В. Катаева (1983):

1. активация меристем в растении;
2. индукция появления почек или эмбриоидов *de no*[12].

В основе клонального микрокломножения лежит явление тотипотентности, то есть способности растения структурно и функционально восстанавливаться из части, органа или отдельной клетки. Тотипотентность проявляется в клетках, называемых меристемоидами - морфогенетически компетентными клетками, которые отвечают на индукторы дифференцировки и состав сред образованием побегов, корней, зародыша. Их отличает крупное ядро, густая цитоплазма и небольшая вакуоль. Такие активно делящиеся клетки расположены в недифференцированной ткани верхушечных (апикальных) меристем, а также меристем пазушных и спящих почек, стебля и т.п.

Методы микрокломнольного размножения можно классифицировать в зависимости от типа меристематической ткани:

1. Активация развития в растениях меристем;
2. Индукция образования новых эмбриоидов, либо стеблевых почек непосредственно на тканях экспланта;
3. Возникновение эмбриоидов, либо почек из первичного каллуса, суспензионной культуры клеток.

Важное отличие двух последних подходов от первого состоит в образовании среди специализированных клеток в результате процесса дедифференциации новых меристематических зон. Первый метод является наиболее лучшим и естественным, поскольку в нем участвуют уже сформировавшиеся меристемы, главное отличие которых является генетическая стабильность. Отличие третьего метода заключается в образовании эмбриоидов через стадию каллуса, тем самым повышая возможность возникновения мутаций.

Основным методом микрокломнольного размножения, является активация развития уже существующих в растениях меристем. Данным

метод состоит из снятия эффекта апикального доминирования. При удалении верхушечной точки роста в пазушных почках, возрастает концентрация цитокининов, а также снижается концентрация ауксинов, и индуцируется клеточное деление и рост пазушных почек. При добавлении в питательную среду цитокининов, можно снять эффект апикального доминирования. Под действием цитокининов происходит также омоложение тканей. Данные ткани обладают большей возможностью к регенерации, и росту побегов и корней.

При введении в культуру *in vitro* через экспланты служат апикальные меристемы или кончики побегов после их стерилизации. Для оздоровления посадочного материала от вирусной, бактериальной и грибной инфекции, используются апикальные меристемы. Только в том случае, если проблема вирусов не актуальна, лучше всего использовать кончики побегов. Необходимо отметить то, что, при большом размере экспланта, увеличивается процент успешной пролиферации в культуре *in vitro*. Но, также повышается опасность инфицирования среды.

### **1.5 Развитие исследований по клональному микроразмножению *in vitro***

Первые работы по микроразмножению в современной биотехнологии растений, под которой следует понимать науку о репродуцировании *in vitro* целостного растения из изолированных микроструктур (клеток, тканей или фрагментов органов), были заложены работами французского биолога Р.Готре, выполненными в сороковых годах перед началом второй мировой войны и получившими дальнейшее развитие в исследованиях самого Р.Готре, его учеников и сотрудников, а также ряда американских, английских и японских физиологов в первый послевоенный период (Gotheret, 1932; Morel, 1952; Бутенко, 1960). Объектом изучения физиологов растений были каллусные культуры *in vitro* ряда видов травянистых растений, среди которых наиболее удобными считались морковь, цикорий, табак, некоторые другие виды. Указанный период исследований составил около двадцати лет.

В 1963 году были опубликованы успешные опыты одного из учеников Готре - Ж.Мореля по репродуцированию целостных растений из апикальных меристем орхидей [20]. Эти исследования были выполнены в возглавляемой им Лаборатории культуры тканей Центральной станции физиологии растений (в Версале) Национального Института агрономических исследований Франции. Работы Ж.Морделя привлекли внимание многих исследователей в целом ряде стран. Интерес к работам по клональному микроразмножению растений был обусловлен тем, что целостные растения в этом случае регенерировались из меристем, клетки которой, в отличие от клеток дифференцированных тканей, не содержали

вирусов. Из-за этого была открыта перспектива получения оздоровленных (свободных не только от бактерий и грибов, но и от вирусов) целостных растений. Начиная с 1965 года, во многих лабораториях различных стран были развернуты интенсивные исследования по клональному микроразмножению *in vitro* многолетних травянистых растений [19-23].

Исследователям удалось репродуцировать состав видов растений методом клонального микроразмножения, который непрерывно пополнялся новыми объектами. К 1980 году в нем насчитывалось много десятков видов растений. Среди них наиболее эффективно репродуцировались земляника [24-25], гербера (Катаева, Бутенко, 1982), мята (Rech, Pires, 1986).

К этому времени были выяснены многие методические вопросы, касающиеся выбора и подготовки маточных растений к акту изолирования почек, приемов изолирования меристем, состава питательных сред, физических условий культивирования *in vitro* и адаптации молодых растений-регенерантов к нестерильным условиям и условий выращивания в открытом грунте. Эти достижения, как было отмечено выше были реализованы на примере репродуцирования многолетних травянистых растений. Основываясь на полученных результатах и экстраполируя их в будущее, многие авторы предлагали в эти годы весьма оптимистические прогнозы развития работ по клональному микроразмножению растений. Эти прогнозы предусматривали, прежде всего, возможность интенсификации биотехнологических процессов с использованием более широкого состава видов растений и получением более значительных партий регенерантов в качестве посадочного материала. Тем временем, становились все более ясными не только преимущества метода клонального микроразмножения растений, но также стали очевидными и многие трудности реализации данного биотехнологического процесса.

К настоящему времени накоплен обширный экспериментальный материал, предполагающий возможность клонального микроразмножения растений, как на основе культуры изолированных меристем, так и при использовании других тканей и органов в качестве эксплантов. На сегодняшний день насчитывается более 200 видов растений, которые были получены в искусственных условиях с использованием микроразмножения [5,10].

## **1.6 Культура изолированных органов и тканей *in vitro***

В качестве одного из нетрадиционных путей сохранения природных ресурсов является использование метода культуры тканей.

Клональное микроразмножение в культуре *in vitro* является одним из методов вегетативного размножения растений, основанного на повторной индукции формирования побегов из пазушных почек, верхушечной меристемы, листьев и других частей растений в стерильной культуре.

Главное преимущество микроразмножения перед обычными способами размножения с помощью семян или вегетативных органов заключается в высоком коэффициенте размножения, что обеспечивает получение огромного количества однородного посадочного материала. Высокий коэффициент размножения через культуру изолированных тканей и органов позволяет сократить сроки получения новых сортов до двух-трех лет. Метод размножения *in vitro* очень экономичен. Тысячи растений могут расти на очень небольшой лабораторной площади. В культуре тканей можно поддерживать рост растений весь год, которое важно для растений, в периоде покоя. При выращивании растений с длительной ювенильной фазой можно добиться ускоренного перехода от виргинильного к генеративному состоянию развития, и, наконец, методом культуры тканей удастся размножить растения, которые с трудом или совсем не размножаются вегетативно. Клональное микроразмножение растений позволяет получать большое количество растений, которые совсем не размножаются вегетативно.



Рисунок 2 – Варианты культивирования клеток, тканей и органов растений на искусственных питательных средах [21].

Факторами, влияющими на процесс клонального микроразмножения являются характеристика экспланта, состав питательной среды, условия культивирования.

При характеристике экспланта учитывают сортовые и видовые особенности, строение и размер экспланта, его происхождение, физиологический возраст, сроки изоляции и содержание эндогенных гормонов. Большинство исследователей склоняются к мнению, что лучшим сроком изоляции экспланта является фаза выхода из состояния покоя и активный рост. Несмотря на существование тесной взаимосвязи между сроком изоляции экспланта и содержанием эндогенных гормонов в них, почти отсутствуют данные о гормональных статусах эксплантов.

Важным условием микрклонального размножения является использование объектов, сохраняющих всю генетическую стабильность на

всех этапах процесса (от экспланта до растений). Данному условию удовлетворяют пазушные почки стеблевого происхождения, а также апексы. Меристематические ткани растений *in vivo* поддерживаются в активно пролиферирующем состоянии. По мнению Р. Г. Бутенко эти ткани устойчивы к генетическим изменениям, возможно вследствие высокой активности систем регенерации ДНК, а также негативной селекции изменившихся клеток. Возможно предположить, что появление пазушных и апикальных меристем стебля тоже вносит вклад в генетическую стабильность. Генетически стабильные пазушные почки, а также бутоны роз являются в настоящее время наиболее предпочтительными объектами для клонального микроразмножения [7,23, 26-30].

Термин "культура клеток, тканей и органов растений" применяется к: изолированным эмбрионам, изолированным органам, каллусной ткани, суспензионной культуре, культуре протопластов (рис.2). Набор объектов растительного происхождения, которые могут быть переведены в культуру *in vitro*, достаточно широк. В основном, большинство исследований проводят с эксплантами разных органов, тканей и клеток растений. Это можно объяснить большой ролью покрытых и голосеменных растений в жизни человечества. Среди них наиболее подходящими объектами для выращивания являются двудольные травяные растения, за которыми следуют однодольные травяные виды и злаки. Сложнее создать условия для устойчивых *in vitro* культур древесных растений, особенно голосеменных [7,20, 25].

Метод культуры растительных клеток и тканей в настоящее время широко используется для решения многих теоретических и практических задач биологии. Это объясняется тем, что данный метод имеет следующие преимущества:

- 1) простота клеточных моделей;
- 2) отсутствие коррелятивного взаимодействия и контроля со стороны других тканей, органов, всего организма, что позволяет отслеживать состояние клеток на уровне первичных основных процессов в ответ на воздействие;
- 3) возможность быстрого получения необходимой растительной массы в асептических условиях;
- 4) контроль по многим параметрам условий выращивания [7].

Поэтому в настоящее время прогресс, достигнутый в растениеводстве, фармакологии, пищевой, парфюмерной, легкой и химической промышленности, тесно связан с дальнейшим развитием клеточных технологий растений и их ускоренным внедрением в народное хозяйство.

### 1.6.1 Метод активации пазушных меристем

Метод микроклонального размножения, активацией пазушных меристем и использованием пазушных побегов основан на снятии апикального слоя или удалением побега, а также микрочеренкованием в пробирке, или введением в питательную среду цитокининов, или наконец сочетанием того и другого. Во всех случаях развившиеся побеги отделяют друг от друга, а затем повторно культивируют на питательной среде.

Регенерация растений из пазушных почек, в данный момент широко используется при размножении ценных генотипов луковичных, древесных, овощных, плодовых культур, которые вегетативно классическими методами трудно размножаются.

Наряду с ягодными, овощными культурами наиболее широкое применение методы клонального микроразмножения нашли среди декоративных культур.

Все области применения микроклонального размножения растительных культур являются важными и значение их будет возрастать. Условно можно разделить эти области по Бутенко Р.Г.:

- быстрое микроклональное размножение *in vitro* растений. В данной этой области достигнуты определенные успехи.
- использование техники *in vitro* по отношению к гетерозиготным, расщепляющимся при скрещивании растениям.
- сохранение редких и исчезающих видов.

### 1.6.2 Культура изолированных зародышей

Впервые, работа, посвященная культуре изолированных эмбрионов, была выпущена более 100 лет назад Р. Ханнингом (1904), который считается основоположником этого метода. Целью данного исследования, проведенного на эмбрионах семейства крестоцветных, было определение условий выращивания эмбрионов вне семени. Работа Ханнинга стимулировала появление подобных исследований, проведенных в разных местах другими авторами.

Начало метода культивирования изолированных эмбрионов в прикладном плане было положено в 1924-1925 годах. Ранние исследования культуры незрелых эмбрионов были направлены на поиск оптимальных условий роста, которые так или иначе приближались бы к исходным. В результате этих исследований были усовершенствованы методы и приемы выращивания незрелых эмбрионов на ранних стадиях создания, определен оптимальный состав питательной среды и другие физико-химические условия культивирования. В последующих исследованиях изучалось влияние жидких и твердых питательных сред на рост изолированных эмбрионов, изучался состав и концентрация различных макро-и



микроэлементов, уточнялись условия углеродного питания, а в дальнейшем исследователи уделяли повышенное внимание роли различных биологически активных веществ, фитогормонов, витаминов, аминокислот и растительных экстрактов на дифференцировку изолированных эмбрионов.

Выращивание эмбрионов в искусственной питательной среде называется эмбриокультурой. Среда для культивирования зрелого эмбриона может быть простой, без добавок, физиологически активных веществ (например, белых сред) или других, содержащих минеральные соли и сахарозу. При отдаленных скрещиваниях нарушения в развитии эмбриона могут наблюдаться уже на ранних стадиях, что выражается в отсутствии дифференцировки, замедленном росте. В этом случае эмбриональная культура состоит из двух стадий-эмбрионального роста эмбриона, в ходе которого продолжается его дифференцировка и прорастание выращенного продуцируемого эмбриона. Первая фаза требует более сложной среды с высоким содержанием сахарозы по массе, с добавлением различных аминокислот, витаминов и гормонов.

С помощью культуры зародышей на искусственных питательных средах можно решать ряд задач прикладного и теоретического значения. Все исследования по культуре зародышей *in vitro* можно разделить на две группы.

В одних работах в контролируемых условиях проводятся выращивание зрелых, в основном сформированных зародышей, в других — зародышей на ранних этапах их эмбрионального развития.

Выращивание зрелых зародышей осуществимо при сохранении стерильности на питательной среде сравнительно простого состава.

При использовании культуры семян и незрелых эмбрионов для достижения отдаленных гибридов желательна предварительная цитоэмбриологическая оценка событий, произошедших во время оплодотворения и на ранних стадиях эмбриогенеза (для определения времени и стадии остановки развития). Это необходимо для того, чтобы определить сроки выделения и подобрать условия для культивирования эмбрионов *in vitro*. Наиболее сложная задача возникает при выборе питательных сред для эмбрионов в недифференцированном состоянии. Помимо обычных БАВ, питательные среды дополняются трофическими факторами: набором аминокислот, набором необычных сахаров, набором осмотических веществ (сорбит, маннит) и т. Д. часто приходится добавлять экстракты неопределенного состава среды, такие как жидкий эндосперм кокоса, каштана и кукурузы. Культура, выделенная бактериями, широко используется в нашей стране: при гибридизации плодовых деревьев, при межвидовой гибридизации хлопчатника, лука, томатов, при межвидовых скрещиваниях ячменя, ржи и пшеницы. Иногда способ модифицируют путем введения переходного этапа получения гибридного каллуса и регенерации растений на его основе. Такой подход используется для получения гибридных табачных растений при скрещивании *N. tabacum* сорт

Дюбск 44 с *N. occidentalis*. В результате скрещивания были получены гибридные семена, но сеянцы погибли в семядольной стадии из-за гибели первичного корня, и рост прекратился. Индукция образования каллусной ткани из семядолей и гипокотилей гибридных растений, а затем органогенез в каллусе позволяют получить сотни амфигаплоидных растений. Затем с помощью колхицина была восстановлена их плодовитость и получено второе поколение амфидиплоидов, которые были скрещены с сортами культивируемого табака. Гибридная ткань каллусу теперь используется не только для клонирования амфигаплоидных эмбрионов, но и для получения вариантных форм. Так, китайские ученые создали более 100 регенератов из одного оригинального гибридного эмбриона, полученного путем скрещивания ячменя и пшеницы. Половина из них сообщила о различиях в морфологии и окраске уха, длине ости и других свойствах, следовательно, речь идет о соматических вариантах. Культивирование *in vitro* изолированных яйцеклеток и семян, потерявших всхожесть, является полезным методом сохранения важного селекционного материала, когда растения повреждаются неблагоприятными погодными или биогенными условиями. Такие методы известны для риса, подсолнечника и картофеля. Эмбриокультура может быть использована для ускорения жизненного цикла растения, что позволит сократить продолжительность процесса отбора. Период генерации озимой пшеницы может сократиться почти на 40 дней, если 16-20-дневные изолированные эмбрионы импровизируют *in vitro*.

Использование эмбриокультуры в селекции в последнее время стало очень важным для получения отдаленных гибридов различных культур. Показано, что можно повысить урожайность пшенично-ржаных гибридов, выращивающих незрелые эмбрионы, а также с помощью эмбриокультуры преодолеть постгамную несовместимость при гибридизации пшеницы, кукурузы. А полноценные растения, полученные из неразвитых миниатюрных семян, характерны для гибридов риса, триплоидных растений ржи при скрещивании автотетраплоидных и диплоидных растений ржи. Используя метод зиготной зародышевой культуры, мы получили селективно ценные формы вишни, персика и груши.

Метод эмбриокультуры все чаще используется при межвидовой гибридизации растительных растений. Для репчатого лука разработаны методы выращивания *in vitro* несостоявшихся спичечных эмбрионов из гибридных семян, с разных стадий эмбриогенеза, выращивания эмбрионов из частично фертильных межвидовых гибридов.

Изучена гормональная регуляция роста и развития эмбрионов томатов *in vitro*. Обсуждаются возможности использования эмбриокультуры для получения отдаленных гибридов подсолнечника, а также исследуются факторы, контролирующие рост и развитие *in vitro* эмбрионов подсолнечника, выделенных в разное время после опыления.

Культура изолированных эмбрионов как вспомогательный метод дистанционной гибридизации используется не только для преодоления постгамной несовместимости, но и в целях микроразмножения ценных гибридов. В этом случае микроразмножение происходит с образованием каллуса, индукцией морфогенеза и приобретением регенеративных растений из ткани каллуса (Рис .1). Методика выращивания незрелых эмбрионов позволяет воспроизводить ценные генотипы растений на ранних стадиях жизненного цикла. Еще одним вариантом использования зародышевой культуры является ее использование при отборе клеток.

Выполнено значительное количество исследований по выращиванию зрелых зародышей. Исследовали возможность получения межвидовых гибридов перца при культивировании зародышей на различных питательных средах [31].

Использовали культуру зародышей *in vitro* для преодоления нескрещиваемости при межвидовой гибридизации подсолнечника [32].

В культуре зрелых зародышей пшеницы изучали влияние регуляторов роста на процессы каллусообразования и побегообразования [33].

Установлено возникновение зон вторичной дифференциации в каллусных тканях из зародышей ячменя 6 сортов в процессе культивирования и показана возможность получения растений-регенерантов [34]. Использование культуры зародышей позволило получить от отдаленных скрещиваний в подсемействе *Prunoideae* гибридное потомство первого и второго поколений [35]. Каллусные культуры, полученные из зародышей риса посевного (*Oryza sativa* L.) выращивали на питательной среде, содержащей сорбит и маннит в концентрации 3 %. Среда с сорбитом и маннитом вызывает длительное сохранение тотипотентности культур риса с высокой частотой (50-60 %) дифференциации побегов [34].

Проведено культивирование *in vitro* изолированных зародышей гибридных форм косточковых пород [36].

Получены данные первичного изучения плодоносящих сеянцев черешни, полученных из зародышей неполноценных семян ранозревающих сортов в культуре *in vitro*. Показана целесообразность использования эмбриокультуры в селекционном процессе, когда исходные материнские формы отличаются наличием неполноценных семян, не дающих всходов в обычных условиях выращивания [37].

Выявлены особенности развития зародышей миндаля, бобовых, фикуса афганского под влиянием питательной среды с разными добавками в отсутствие собственной эндоспермальной ткани [36-37].

Метод культуры зародышей может быть применен в работе с трудно- и долгопрорастающими семенами, которых в растительном мире немало. Изучена особенность регенерационных процессов в культуре изолированных гибридных зародышей трех видов *Iris* [38].

Разработаны условия получения регенерантов из незрелых зародышей злаков и других хозяйственно-ценных культур.

На среде MS, содержащей 2,4-Д незрелые зародыши кукурузы продуцируют узкий рубчик ткани в центральной части зародыша. Рубчик пролиферируется и формирует морфогенный каллус [38].

Исследовали изменчивость растений-регенерантов, возникших из каллусных культур незрелых зародышей пшеницы. Среди потомства растений-регенерантов обнаружены линии, отличающиеся от контрольного сорта большим содержанием белка в зерне [39].

Исследованы морфогенетические процессы в культуре тканей кукурузы, полученной из незрелых зародышей линии МК 01. Отмечено образование эмбриогенного и с зелеными участками каллуса, на которой наблюдали различные типы морфогенеза: корнеобразование, формирование листьев и побегов [40].

Изучали особенности культивирования незрелых зародышей вишни и сливы. Показана возможность получения морфологически нормальных растений из 30-45-60 дневных зародышей. Наблюдали формирование нескольких побегов с одного зародыша и последующее их укоренение (Курсаков, 1988).

Для успешного получения растений при отдаленной гибридизации пшеницы с эгилопсом М. М. Талат с авторами (1997) использовали как прямую регенерацию из изолированных зародышей, так и регенерацию из каллуса, образованного на зародышах.

Изучена частота множественной регенерации растений в первичных каллусах, полученных от незрелых зародышей трех ранне- и позднеспелых сортов ячменя, различающихся по размеру, степени прозрачности и морфологической дифференциации (Дунаева и др., 2000).

Сведений о размножении тюльпанов методом культуры изолированных зародышей для получения и ускоренного размножения гибридных форм единичны.

Незрелые семенные коробочки различных сортов тюльпана Геснера (*T. gesneriana*) были собраны через 9-10 нед после опыления. Определяли влияние предварительной холодной обработки культуры в теч 8-12 нед на прорастание семязачатков, различных температур, продолжительности освещения, содержания сахарозы и неорганических компонентов. Количество проросших семязачатков возрастало после обработки культуры холодом, освещенности до 8 ч, 6 % сахарозы и полным объемом неорганических компонентов. При этих условиях на столонах формировалось до 90 % луковичек. Однако их приживаемость при пересадке в почву была невелика (Custers and other, 1992).

Для получения гибридных форм тюльпанов от 5-ти комбинаций скрещивания определены сроки изоляции зародышей, влияние степени их дифференциации на приживаемость в культуре *in vitro* на различных

питательных средах и режимы культивирования при формировании микролуковичек (Коломиец, 1997).

В качестве объектов, используемых для экстракорпорального культивирования *in vitro*, также могут выступать мхи, лишайники и папоротники. Культуры их клеток используют для изучения специфических для указанных растений процессов. Многоклеточные водоросли трудны для поддержания их в культуре, хотя они, несомненно, перспективны в качестве источников фитопродуктов для медицины, пищевой промышленности и других биотехнологий. Большое внимание биологи отводят выращиванию микроводорослей.

Метод культуры зародышей *in vitro* позволяет в строго контролируемых условиях изучать морфогенетические и морфофизиологические аспекты эмбриогенеза, что необходимо для понимания сущности закономерностей роста зародыша, процессов его дифференциации, коррелятивных связей с эндоспермом и тканями материнского организма в период эмбриогенеза, а также для выявления возможностей управления этими процессами (Батыгина и др., 2002). В результате этих исследований методика и техника выращивания незрелых зародышей ранних этапов формирования была значительно усовершенствована. Были определены оптимальный состав питательной среды и другие физико-химические условия выращивания. В настоящее время метод культуры незрелых зародышей ранних этапов эмбрионального формирования продолжает разрабатываться и совершенствуется.

Метод культивирования эмбриона *in vitro* перспективен для расширения генетического разнообразия культуры и ускорения селекционного процесса в целом. При выборе каменной культуры эмбриокультура *in vitro* позволила преодолеть половую само-и кросс-несовместимость в межвидовых и межпоколенческих скрещиваниях, повысить урожайность гибридных растений в скрещиваниях с участием отдаленных форм при отборе по нескольким признакам (ранняя зрелость, устойчивость к болезням и неблагоприятным факторам окружающей среды, морозостойкость, самооплодотворяемость, засухоустойчивость, низкорослость).

Работа с изолированными эмбрионами из зрелых семян достаточно проста и может быть организована в любой лаборатории селекционной станции. Сложнее работать с эмбрионами, выделенными на ранних стадиях развития из незрелых семян. Значительно меньшие размеры эмбриона и органов, из которых он выделен, создают технические трудности. Но самое сложное в данном случае это выбор питательной среды, которая должна обеспечить развитие эмбриона в то состояние, которое он имеет в зрелом семени при его прорастании и росте.

Анализ представленных материалов показывает, что применение различных методов интродукции, а также использование современных

достижений биотехнологии позволяет совершенствовать декоративные и хозяйственно-ценные свойства цветочных культур [32-36].

Таким образом, за последние десятилетия был сделан большой прорыв при разработке методик работы с изолированными растительными тканями и клетками в основном на однодольных и двудольных травянистых растения. Древесные растения в этом направлении использовались очень редко, что подтверждает необходимость развития этой области исследований.

### 1.6.3 Адаптация *in vitro* растений к нестерильным условиям

Адаптация растений-регенерантов к условиям выращивания *ex vitro* является заключительным и наиболее критическим этапом микроразмножения растений. До сих пор неудачи на этом этапе у многих видов растений существенно снижают эффективность их размножения *in vitro*. Поэтому важно выявить причины, приводящие к гибели микрорастений.

Некоторые авторы выделяют комплекс факторов, влияющих на жизнеспособность микрорастений в период адаптации. Условия *in vitro*, и главным образом его отдельные элементы, такие как сахароза в питательной среде и высокая влажность воздуха внутри емкости для выращивания, подавляют функции растения, необходимые для развития в *ex vitro* условиях.

Условия дефицита углекислого газа вызывают соответствующее приспособление ассимиляционной ткани листьев, изменение функциональной активности фотосинтетического аппарата [6].

Иссушение в этот период приводит к гибели. Это связано с нефункционирующими устьицами, недостатком кутикулярного воска, сильной транспирацией, а также сокращением поглощения воды корнями. Устьица *in vitro* растений не функционируют в течение 10-14 дней после пересадки. Поэтому микрорастения, высаженные на адаптацию, в течение этого периода теряют большое количество воды. По данным некоторых авторов, причиной может быть длительное нахождение растений под влиянием цитокининов, а также условия дефицита углекислого газа. Поэтому желательно, чтобы ко времени переноса растений они имели листья с функционирующими устьицами. Иначе это приведет к увяданию при переходе к естественным условиям выращивания [6; 11].

Следует еще раз подчеркнуть значение поддержания в адаптационной теплице оптимальной для *in vitro* растений влажности. Благодаря высокой влажности воздуха (более 75%), высаженные на адаптацию растения не погибают даже при высоких температурах +45...+50 оС. Однако, при снижении влажности воздуха в теплице до 60% гибель листового аппарата будет наблюдаться уже при температуре воздуха +40 оС [14].

Дисбаланс между листовым аппаратом и корневой системой в плане функциональных возможностей, их размера и строения, высокий уровень восприимчивости к патогенной инфекции ставят микрорастения в значительно более трудное положение, чем проростки семян сорных и даже культурных растений. Корнацкий С.А. отмечает, что рост и развитие последних происходят постепенно и последовательно под действием запаса нативных гормонов, витаминов и питательных веществ, поэтому адаптация к условиям окружающей среды происходит естественно и безболезненно, за исключением случаев воздействия сильнопатогенной инфекции. Однако даже среди относительно генетически-однородного семенного материала разные партии отличаются жизнеспособностью в полевых условиях и силой роста. Различия в действии упомянутых Корнацким С.А. факторов и обуславливают высокий процент гибели растений-регенерантов в сравнении с проростками семян [6; 11].

В тех случаях, когда после обработки ауксинами у микрочеренков появляется каллус и формируются толстые корни. В этом случае, как правило, между корнями и побегами осуществляется плохая сосудистая связь. В формирующихся боковых корнях также отмечаются изменения в проводящей системе. Нормально образующиеся корни те, которые регенерируют без образования каллуса. Следует также отметить, что формирующаяся в условиях *in vitro* корневая система регенерантов часто характеризуется отсутствием корневых волосков, а также корней второго порядка. Выявлено, что у микрорастений функционирующая корневая система формируется за 2-4 недели, в зависимости от породы, что необходимо для обеспечения водопотери в случае снижения влажности воздуха. Резкое снижение влажности воздуха, как отмечалось выше, губительно в этот момент. Периода от двух до пяти дней, в течение которых адаптация должна проходить постепенно, как правило, достаточно для того, чтобы обеспечить полную сохранность растений [6; 11].

Как правило, микрорастения садовых культур для адаптации к нестерильным условиям в марте – апреле переносят в обогреваемые теплицы, где их пересаживают в пикировочные ящики, кассеты, пластиковые контейнеры или пленочные укрытия, заполненные приготовленным заранее искусственным субстратом. В течение периода адаптации в теплицах поддерживается высокая относительная влажность 75-90% и температура воздуха 22-28°C, а также освещенность 2-5 тыс. люкс при фотопериоде 15-18 часов [3; 4; 15; 17; 20].

Большинство исследователей рекомендуют для перевода микрорастений из стерильных условий произрастания в нестерильные не использовать микрорастения определенных параметров с длиной корней и высотой микропобега 2,0 см и более (кондиционные растения) [20; 24]. Для адаптации микрорастений малины оптимальным считается возраст 45-60 дней [17; 19; 20].

Большое влияние на процессы адаптации регенерантов *ex vitro* оказывают искусственные субстраты. Известны способы адаптации и доращивания микрорастений в условиях зимних обогреваемых теплиц на искусственных субстратах, состоящих из органической основы (кора хвойных пород, торф, компост, льняная костра, почва, древесные опилки) [14; 16; 18] и инертных материалов (песок, вермикулит, минеральная вата, перлит, цеолит, глауконит) [5; 20; 21].

В технологии клонального микроразмножения наиболее часто используют смесь перлита и низинного или верхового торфа [3; 7; 8], которую обеззараживают 0,1% раствором бенлата, эупарена [9; 18,], противомикробными растворами с добавлением тетразола [18] или обрабатывают горячим паром [16].

Наблюдается преимущество обеззараживания субстрата при переводе пробирочных растений в нестерильные условия. Так как препараты действуют на самом критическом этапе адаптации, повышая жизнеспособность и смягчают стресс при акклиматизации.

Отказ от стерилизации почвенного субстрата горячим паром при использовании растворов препаратов, перечисленных выше, значительно упрощает процесс пересадки, экономит время, затраты труда и электроэнергию [10].

Таким образом, на этапе микроразмножения для растений-регенерантов необходимо создание таких условий, при которых они будут способны продолжить свой рост и развитие в новых для них условиях – *ex vitro*. Только с учетом всех перечисленных факторов можно обеспечить успех этапа адаптации, а процесс доращивания сделать предсказуемым.

## **1.7 Биологические особенности сортов роз**

Чайно-гибридные сорта являются самыми популярными из всех сортов роз во всем мире. Цветущие кустарники нравятся садоводам за счет красивых и крупных цветков, высокой декоративности кустарников во время цветения, повышенной устойчивости растений к замерзанию и болезням.

Семейство розоцветных - одно из многих и экономически важных семейств цветковых растений в жизни человека. Его жизненные формы включают более 3000 видов постоянных и однолетних трав, лиственных и барвинковых деревьев и кустарников. Эти растения не играют важной роли в создании естественной древесной растительности, но активно участвуют в формировании кустарниковых лесов. Среди розоцветных огромное количество ягодных и фруктовых культур и декоративных растений, на главном месте в том числе которых находятся бесчисленные сорта роз [45].

Ароматные и порой невероятно красивые цветы семейства розоцветных считаются его главной гордостью и отмечены высокой



декоративной ценностью. Они часто используются в производстве парфюмерии, бытовой химии и в качестве декоративных элементов для ландшафтного дизайна. Благодаря вкусным, сочным и богатым витаминами плодам многие виды этого семейства являются основой для выращивания плодовых культур.

Пионовые розы. Селекционер Дэвид Остин получил путем скрещивания французских, Дамасских и Бурбонских роз с современным видом чая-гибридными розами и Флорибундовыми розами. Взрослые гибриды относятся к группе кустарников, характеризующихся силой роста кустарников и полувцветковых форм. Английская роза очень востребована садовниками, а также флористами и дизайнерами [45].

Роза *Red Piano*, как и другие сорта этой серии, была выращена немецкими селекционерами. Из-за яркой окраски многих цветов и многих других положительных особенностей этот многолетник почти сразу же был упомянут флористами как один из самых красивых цветущих кустов.

*Red Piano*, относится к сортам чайно-гибридных роз, представленный в 2006 году всемирно известной фирмой Rosen Tantau. Ее рабочий номер Tan01360, Hope and Glory, Mistinguett. Эта без преувеличения изумительная разновидность была создана в Германии в 2007-ом году. Вывел ее селекционер Christian Evers.

Кустовая роза *Red Piano* выделяется среди других красных роз своей невероятной формой. Плотные бутоны этой старой английской розы, которые постепенно раскрываются, превращаются в большие красные чаши. Каждый цветок имеет более ста лепестков, поэтому розы раскрываются невероятно пышно и элегантно и называются пионовидными [44].

Для высадки роз на определенном участке необходимо соблюдать основные правила:

1. обязательно привести в норму грунт: рыхлая, слабокислый, с достаточным количеством питательных сред;
2. необходимо подкармливать розу различными минеральными кормами и удобрять;
3. участок должен быть открытым, хорошо освещаемый солнцем, без сквозняков.

Розы Cordes названы в честь их создателя Вильгельма Кордеса, основателя компании " W. Kords & Sons", чья Роза наиболее известна в Европе. Все розы Cordes прививаются на шиповник (*Rosa canina*, *hundsrosa*), который считается самым надежным для нашего климата, так как имеет сильную корневую систему, морозостойкий и неприхотливый уход. Закрытая корневая система роз позволяет временно закапывать саженцы в почву, не повреждая корни. Посадка также должна производиться в сетку и, в дальнейшем, разложение в почве, при этом никаких дополнительных удобрений использовать не следует, они уже находятся в почвенной смеси.

Роза *Floribunda Pomponella* - плотный цветок, распускающийся в форме полукустарника, упакован мягкими розовыми лепестками и своей формой напоминает изящный шар. Цветки примерно 5 см в диаметре распускаются по 5-10 штук на одном побеге. Форма и красивый цвет, который простирается от жемчужного до фиолетового оттенка, остаются на протяжении всего периода цветения. [45].

Розы цветут не в одну волну, как чайно-гибридная роза, а почти непрерывно в течение всего лета и осени. Неудивительно, что *Floribunda* означает "обильноцветущий".

Лепестки роз указывают на хорошую зимнюю твердость и устойчивость к болезням. Розы высаживают на открытых, хорошо освещенных участках, защищенных от ветра. Желательны иссушенные, слабокислые, глинистые почвы.

### **1.7.1 Особенности размножения роз**

Клональное микроразмножение основано на возможности растения к регенерации органов. Из отдельных частей возникает целое растение, которые имеют все характерные свойства данного вида, а также материнского растения.

Главные преимущества вегетативно размножаемых растений:

- они на порядок выше, поэтому быстрее зацветают;
- однородны как генетически и анатомически, так и функционально-физиологически по индивидуальному развитию;
- также можно закрепить неожиданные мутации;
- более выносливы;
- применяя культуру тканей, можно спасти растения от самых различных заболеваний, например от вирусных [46, 47].

Имеются многочисленные исследования декоративных роз, как отечественных, так и зарубежных ученых. Основная часть публикаций предназначена для производства посадочного материала без вирусов и сырья для парфюмерной промышленности. Эти исследования показывают, что состав питательной среды подбирался путем оптимизации концентраций микроэлементов, витаминов и регуляторов роста. Апикальная меристема была использована для культивирования *in vitro*.

## **2 МЕТОДЫ И ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1 Материалы исследований**

Выбор экспланта в микроклональном размножении играет важную роль в последующей индукции процессов роста и развития в культуре *in vitro*. При выборе экпланта, необходимо учитывать: вид растения, фазы развития растения и развития органов из которых взят эксплант, а также времени года.

Материалом для исследования были свежие бутоны роз, размером 5–9 см см каждого сорта, полученные в питомнике Nicole. Свежесрезанные бутоны делили на несколько фрагментов, размером 5-9 см, которые затем помещались на питательную среду и были использованы в качестве экпланта.

В качестве потенциального варианта экпланта, использовались пазушные почки вышеназванных сортов роз размером 0,5 – 1,0 см. Для получения пазушных почек использовали среднюю треть молодых активно растущих побегов.

### **2.2 Методы исследования**

#### **2.2.1 Стерилизация растительного материала**

Для оптимизации стадии стерилизации растительного сырья были испытаны различные стерилизующие агенты: гипохлорит натрия, перманганат калия, этанол.

Стерилизацию сегментов бутонов проводили в несколько этапов. Растительный материал промывали в проточной водопроводной воде с мыльным раствором. Далее посадочный материал несколько раз промывали стерильной дистиллированной водой. Срезав листья, зародыши помещали в стерильные стаканы и последовательно обрабатывали растворами стерилизующих агентов. В качестве переменного параметра изменяется процентный состав стерилизуемого объекта "Белизна", а также время выдержки этанола. «Белизна» используется в следующих процентах: 20%, 15% и 10 %, а процентное содержание этанола и перманганата калия остается неизменным. При изменении процентного содержания стерилизуемых изделий была выбрана оптимальная концентрация для дальнейшей стерилизации.

Чтобы определить степень стерилизации, нужно поместить экспланты в специальные колбы в условиях полной темноты при комнатной температуре на неделю. Через неделю вы можете увидеть, где был заражен материал, и удалить его [48].

### **2.2.2 Получение каллусной культуры роз путем надреза зародыша.**

Поверхность стерилизованных зародышей роз надрезали крестообразным способом, не повреждая донце и помещали на питательную среду Мурасиге-Скуга (МС) (Приложение 3) для инициации роста каллусных клеток, для роста и размножения зародышей роз. Экспланты находились в культуральной комнате с температурой +20С, с фотопериодом 16/8 часов и освещенностью 10 тыс. люкс.

### **2.2.3 Клональное микроразмножение**

Освоение технологии клонального выращивания роз *in vitro* имеет большое значение с точки зрения создания высококачественного посадочного материала. Рассмотрены и оптимизированы основные этапы клонального микроразмножения растений роз *in vitro*. Предложен эффективный способ стерилизации бутонов этой культуры путем введения эксплантов *in vitro*. Для микроразмножения и регенерации растений из меристем изученных сортов роз были отобраны питательные среды Мурасиге и Скуга (МС). Регуляторы роста растений оказывают значительное влияние на морфогенез при клональном микроразмножении. Особую роль на этапе собственно самого клонального микроразмножения отводится цитокининам. Скорость и степень пролиферации зависят от типа цитокинина и его концентрации [Матушкина, Пронина, 2010].

Экспланты помещали в пробирки на агаризованную питательную среду. В качестве базовой среды использовали среду Мурасиге и Скуга (Приложение 1) [46], рН 5,8. Сахароза была использована в качестве источника углерода в концентрации 20 г/л. Для получения полутвердой питательной среды используется агар-агар в концентрации 5-9 г/л. Экспланты находились в культуральной комнате с температурой +20<sup>0</sup>С, с фотопериодом 16/8 часов и освещенностью 10 тыс. люкс.

### **2.2.4 Адаптация**

Растения для адаптации к нестерильным условиям высаживали в пластиковые контейнеры объемом 150 мл с субстратом, содержащим торф, песок и перлит в пропорции 1:1: 1, горшки закрывали полиэтиленовыми пакетами. После посадки проводили внекорневую подкормку раствором макро- и микроэлементов, соответствующим половине концентрации среды Мурасиге и Скуга.

### 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Процесс микрклонального размножения должен осуществляться в специально оборудованной лаборатории с высокой степенью стерильности. Кроме того, сам растительный материал должен быть стерильным. Получение стерильного исходного материала, является сложной задачей, так как на поверхности тканей, органов растений происходит заражение бактериями, грибами и их спорами. При недостаточной стерилизации материал заражается микроорганизмами, вредными для культуры. Обычно режим стерилизации устанавливается экспериментально для каждого объекта. Выбор оптимальных условий стерилизации посадочного материала, был первой экспериментальной задачей.

Растения-регенеранты могут быть получены путем активации существующих апикальных и пазушных меристем, образования растений *de novo* из каллусной ткани. Эксплантами для введения в культуру *in vitro* могут быть использованы семена, апикальные меристемы побега и корня, почки возобновления.

В качестве эксплантов использовали бутоны роз размером 5–9 см, а также в качестве контрольного экспланта, использовались пазушные почки роз размером 0,5 – 1,0 см, взятые из средней трети молодых, активно растущих побегов, для сравнительного аспекта в данной работе. Полученные пазушные почки также стерилизовали и культивировали на питательной среде для проверки их на возможность использования в качестве потенциального экспланта.

В ходе исследования было установлено, что эффективное размножение с целью получения растений-регенерантов сортов *Floribunda Pomponella* и *Red Piano* возможно при использовании в качестве эксплантов зародыши роз. Время для введения в культуру *in vitro* эксплантов подбирается индивидуально для каждого вида и зависит от природы экспланта и феноритмов развития растений.

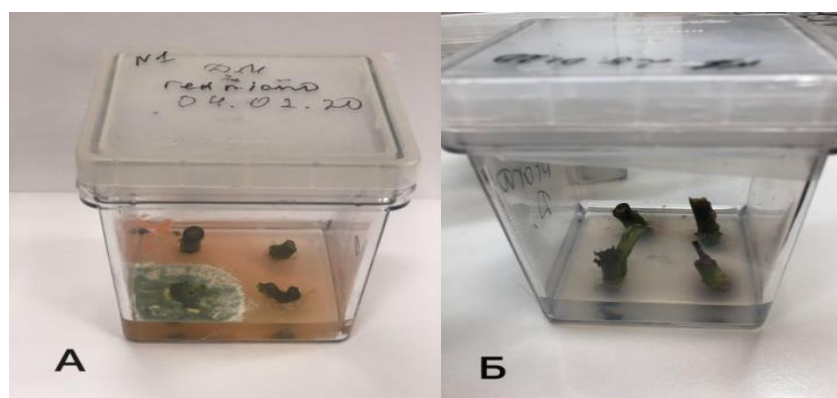




Рисунок 3 – Результаты стерилизации пазушных почек роз  
А – сорт *Red Piano*; Б - сорт *Floribunda Pomponella*

В случае с почками, по результатам проведенных опытов ни один из способов стерилизации не был идеальным, как мы можем увидеть на рисунке 3, по этой причине в конечном итоге материалом исследования были выбраны бутоны роз.

Таблица 1 – Краткая характеристика исследуемых сортов роз

Внешний вид	Краткая характеристика сорта
	<p>Роза сорта <i>Floribunda Pomponella</i> был выращен одной из самых известных в мире компаний по выращиванию роз — "W. Kords &amp; Sons". Этот сорт относится к классу флорибунд (Floribund), что означает "обильное цветение".</p> <p>В хороших условиях и должном уходе растение достигает высоты 185 см, в ширину 160 см.</p> <p>Густомахровые. В начале цветения канонический бутон постепенно становится сферической. Бутон (диаметр 4-5 см) состоит из 80-85 листов. Каждый из них имеет 5 или 15 цветов. Куст зацветает к концу весны. В обильном цветении до самой осени [44].</p>
	<p>Роза сорта <i>Red Piano</i> относящиеся к группе чайно – гибридных роз может использоваться как при выращивании, так и для срезки, данные розы очень долго цветут вплоть до последних заморозков.</p> <p>Роза Red Piano представляет собой компактный кустарник средней высоты (побеги вырастают примерно до 1 м длиной), диаметром не более 0,6 м. листовые пластинки большие, причем с характерным глянцевым блеском и темно-изумрудным цветом. Каждый цветок имеет не менее 95 лепестков. Бутоны издают нежный фруктовый аромат и обычно собираются в ранние состояния, каждое из которых имеет не менее 3 цветков. Эта гибридная роза устойчива к большинству болезней, может использоваться для стрижки и озеленения [45].</p>

### 3.1 Подбор оптимальных условий стерилизации растительного материала

Строгая стерильность является обязательным условием для работы с изолированной культурой тканей. В соответствии с условиями асептики при выполнении работ по выращиванию растений *in vitro* операционное помещение, в котором производится утепление и посадка сельскохозяйственных культур, одежда и руки рабочего персонала, инструменты, используемые для выращивания объектов, все необходимые инструменты и материалы, питательные среды и объекты выращивания должны быть стерилизованы. Как показывает практика, неосторожность, допущенная в ходе эксперимента, даже если рабочее место хорошо оборудовано, сводит к нулю все приложенные усилия. Поэтому чистота гораздо важнее сложного специального оборудования

Главным условием успешного культивирования и выращивания каллусных и суспензионных культур является стерилизация растительных объектов, заключается в уничтожении грибных и бактериальных спор на внешней поверхности без повреждения внутренних тканей. Для этого используют различные стерилизующие вещества.

Тип стерилизующего агента, его концентрация и продолжительность применения зависят от плотности и чувствительности стерилизуемой ткани. Правильный выбор стерилизующего агента заключается в том, что он оказывает вредное воздействие на все микроорганизмы и в то же время минимально повреждает ткани. Еще одним важным условием является то, что стерилизатор должен быть легко удален из ткани путем промывки ее дистиллированной водой или разложения. В противном случае происходит отравление тканей, что отрицательно сказывается на образовании и росте каллуса.

Для стерилизации основных объектов исследования – зародышей роз, нами проведен этап подбора условий стерилизации. В качестве стерилизующих объектов использовались: «Белизна», 70% этанол и перманганат калия. Подбор стерилизующих условий проводили в трех вариантах: в первом варианте процентный состав «Белизны» составил 20%, во втором - 10 %, в третьем – 15%. Процентное содержание 70% этанола и 0,1% раствора перманганата калия оставалось неизменным во всех вариантах. При этом, в каждом из вариантов время выдержки эксплантов в 0,1%растворе перманганата калия было разным. В первом варианте - 4 минуты, во втором – 3минуты, в третьем – 2 минуты, соответственно.

Предварительно подготовленные бутоны роз промывали в проточной воде. Эксплант держали некоторое время в этаноле, после чего в растворе гипохлорида натрия, а затем в перманганате калия. Далее посадочный материал несколько раз промывали стерильной дидистиллированной водой, а затем помещали в питательную среду (рис 4). Пробирки с эксплантами

затем помещают в тёмную комнату при комнатной температуре на одну неделю, чтобы определить степень стерильности. Т.е пробирки, в которых началось заражение, должны быть немедленно удалены.

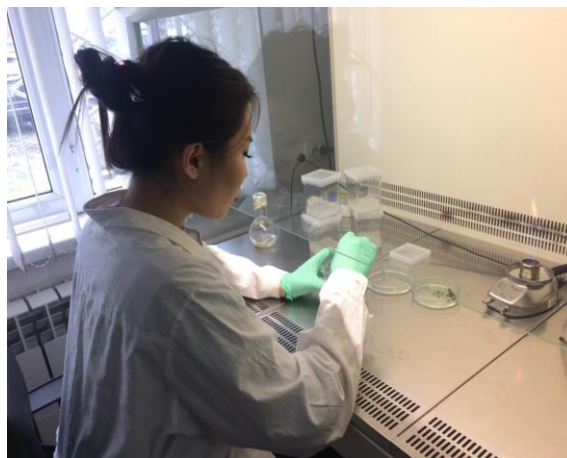


Рисунок 4 – Работа в ламинарном боксе

Всего на данном этапе исследования использовали 3 способа проведения стерилизации экспланта, состав и время экспозиции в которых представлены в таблице 3. Подбор осуществляли на бутонах двух исследуемых сортов роз. Процесс клонального микроразмножения, проводится в специально оснащенной лаборатории, а также должна быть полностью стерильной. Непосредственно сам растительный материал, также должен быть стерильным, именно по этой причине, проводится стерилизация экспланта, для дальнейшего проведения эксперимента

Таблица 2 – Подбор условий стерилизации

Варианты стерилизации	Концентрация стерил. агента, %	Обработка, мин
1 способ		
Мыльный раствор		30
Гипохлорит натрия	20	10
Перманганат калия	0,1	4
Этанол	70	5
H <sub>2</sub> O	дист	30



2 способ		
Мыльный раствор		30
Гипохлорит натрия	10	10
Перманганат калия	0,1	3
Этанол	70	5
H <sub>2</sub> O	дист	30
3 вариант		
Мыльный раствор		30
Гипохлорит натрия	15	10
Перманганат калия	0,1	2
Этанол	70	5
H <sub>2</sub> O	дист	30

Оценку эффективности всех 3 способов обработки проводили по соотношению числа инфицированных / стерильных эксплантов по отношению к общему количеству введенных в культуру эксплантов (таблица 3).

В течении 3-4 недель после стерилизации мы наблюдали зарост в маджентах с эмбрионами *Red Piano*, обработанный способом 1, на 9 день культивирования.

Затем было выявлено, что для роз сорта *Floribunda Pomponella* стерилизация, также не обвенчалась успехом, выявили бактериальное заражение на 11 день. То, есть мы можем заметить, что стерилизация первым способом не была успешной.

При анализе второго способа стерилизации, концентрацию «Белизны» уменьшили, а также изменили время выдержки этанола и перманганата калия.

В дальнейшем мы заметили, что при подборе стерилизации вторым способом, стерилизация для обеих сортов прошла успешнее, чем на первом.

Как видно из таблицы 3, экспланты оставались жизнеспособными при всех испытанных условиях стерилизации. Через 2-3 недели на эмбрионах сорта *Red Piano*, был замечен прирост, но в дальнейшем было замечено, что 2 второй способ стерилизации не был оптимальным для данного сорта. А для сорта *Floribunda Pomponella* оказалась подходящей для дальнейшего культивирования. При данном исследовании, было отмечено, что 2 способ, оказался оптимальным, для данного сорта роз, как мы можем наблюдать в таблице 3.

Таблица 3 – Влияние условий стерилизации

Сорт	1 способ		2 способ		3 способ	
	Доля инфицированных, %	Доля стерильных, %	Доля инфицированных, %	Доля стерильных, %	Доля инфицированных, %	Доля стерильных, %
<i>Red Piano</i>	95	5	60	40	15	85
<i>Floribunda Pomponella</i>	90	10	10	90	45	55

Как видно из табл. 3, для всех данных условий стерилизации, результаты исследования были достаточно различны.

Анализ результатов, полученных в данном эксперименте, показал, что первый вариант стерилизации оказался малоэффективным для зародышей обоих сортов. Для эксплантов розы сорта *Red Piano*, первичное бактериальное заражение, в среднем, отмечалось на 9 день культивирования. Для эксплантов розы сорта *Floribunda Pomponella* первичное бактериальное заражение, в среднем, отмечалось на 11 день культивирования.

Как видно из данных, приведенных в таблице 3, для сорта *Red Piano*, стерилизуемых данным способом, соотношение % зараженных эксплантов по отношению к здоровым составил 95/5 (рисунок 5 А). Для сорта *Floribunda Pomponella*, стерилизуемых данным способом, соотношение % зараженных эксплантов по отношению к здоровым составил 90/10 (рисунок 5 Б).



Рисунок 5 – Первый способ стерилизации на эксплантах роз

А – сорт *Red Piano*; Б - сорт *Floribunda Pomponella*

Учитывая, что данный вариант стерилизации проводился в трех повторностях, и результаты каждого повтора мало отличались, был сделан вывод, что данный способ стерилизации не пригоден для обработки зародышей роз этих двух сортов.

Результаты, полученные при использовании второго способа стерилизации, показали, что при уменьшении концентрации стерилизующего объекта «Белизна» до 15 %, а также уменьшении времени выдержки эксплантов в 0,1% растворе перманганата калия до 3 минут, стерилизация была более успешной. Для сорта роз *Red Piano*, обработанных вторым вариантом стерилизации, на 14-21 день культивирования отмечался значительный прирост растительной массы, однако также % соотношение зараженных эксплантов по отношению к здоровым составил 60/40, что свидетельствует о плохой стерилизации эксплантов данным способом (рисунок 6 А).

Как следует из данных, приведенных в таблице 3, для сорта *Floribunda Pomponella* данный вариант стерилизации оказался наиболее оптимальным и пригодным с целью обработки эксплантов для введения в культуру *in vitro*. Доля инфицированных эксплантов составила 10%, тогда как 90% эксплантов культивировались без заражения (рисунок 6 Б).

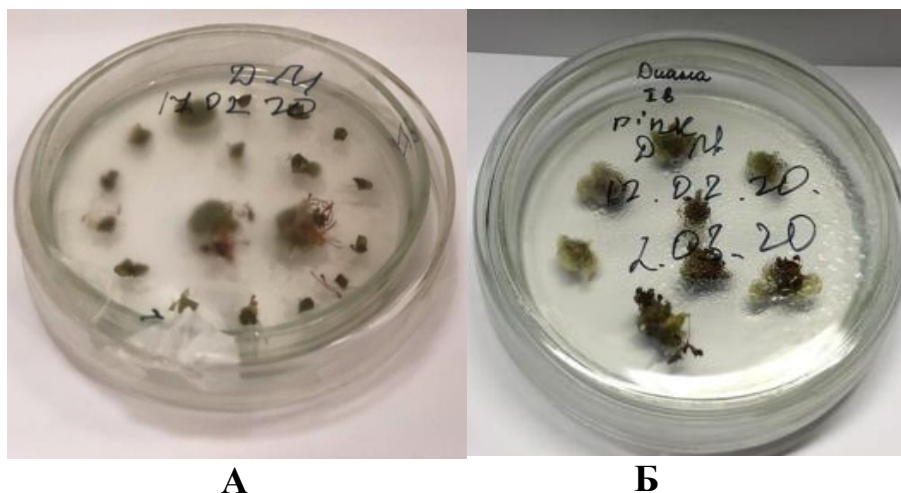


Рисунок 6 – Второй способ стерилизации эксплантов роз

А – сорт *Red Piano*; Б - сорт *Floribunda Pomponella*

Учитывая необходимость подбора оптимального способа стерилизации для обоих сортов роз, использовали третий вариант стерилизации, где процент гипохлорида натрия («Белизна») снижен до 10, время выдержки эксплантов - 10 мин. Кроме того, в данном варианте стерилизации уменьшено время обработки раствором 0,1% перманганата калия до 2 мин. Все эксперименты проводились в трех повторениях.

В этом варианте стерилизации, число инфицированных эксплантов оказалось больше у сорта роз *Floribunda Pomponella* – 45% (рисунок 7 А), тогда как для эксплантов сорта роз *Red Piano* данный вариант стерилизации оказался самым оптимальным, так как процентная доля стерильных эксплантов составила 85% (рисунок 7 Б).



Рисунок 7 – Третий способ стерилизации эксплантов роз.

А – сорт *Floribunda Pomponella*; Б - сорт *Red Piano*

Анализ представленных в таблице 3 результатов показал, что из 3 исследованных способов стерильной обработки бутонов роз голландского происхождения наименее эффективным оказался 1-й вариант.

Наилучший показатель по числу стерильных эксплантов из растений сорта роз *Red Piano* получен после обработки 3 способом. Однако, для эксплантов полученных из бутонов роз сорта *Floribunda Pomponella*, этот вариант стерилизации оказался не столь успешным. Для этого сорта роз, наиболее оптимальным оказался второй вариант стерилизации, где использовали 15% гипохлорид натрия и время обработки 0,1% раствором перманганата калия - 2 минуты.

Таким образом, на основе полученных данных анализа эффективности нескольких способов стерилизации зародышей роз для введения их в культуру *in vitro* для сорта *Red Piano* выбран 3 способ стерилизации. Для эксплантов, полученных из бутонов роз сорта *Floribunda Pomponella* оптимальным способом стерилизации выбран 2 вариант.

Из полученных в данном эксперименте результатов можно сделать вывод, что у всех исследуемых растений степень внешней загрязненности был разным.

### 3.2 Подбор оптимального состава питательной среды

Одним из наиболее важных моментов в культивировании клеточных культур растений является подбор оптимальных условий. Ключевым фактором в культивировании является выбор состава питательной среды.

В работах таких учёных, как Глежери и Пилунская, Бугара в 2000 году применявших различные составы питательных сред для размножения роз, было показано, что наиболее оптимальной средой является среда Мурасиге Скуга (МС). В их работах отмечалось, что при введении эксплантов роз среда МС вызывает такие явления, как появление каллусной ткани и витрификации. При промышленном производстве растений, появление таких качеств в стерильной культуре, является крайне нежелательным. В связи с этим, для введения эксплантов роз в культуру *in vitro* нами был проведен этап подбора оптимальных питательных сред для каждого сорта исследуемых растений.

В качестве базовой среды для культивирования использовали среду МС с различным содержанием фитогормонов. Всего для каждого сорта роз было использовано 3 варианта питательных сред, состав и содержание фитогормонов представлено в таблице 4.

В каждый из вариантов питательных сред, добавляли различное соотношение ауксинов (2,4-Д, НУК) и цитокининов (кинетин), с целью возможности выбора наиболее оптимальной для культивирования среды. В качестве испытываемых сред использовали стандартные МС среды, содержащие 2,4-Д, НУК (0,5 мг/л), а также кинетина.

Эффективность среды для каждого сорта определяли по количеству эксплантов.

Таблица 4 – Подбор вариаций питательных сред для получения растений – регенерантов

№ варианта среды	Питательная среда	Вариации фитогормонов	
		ауксины, мг/л	цитокинины, мг/л
I	Мурасиге-Скуга	2,4-Д - 0,5 мг/л НУК (0,5 мг/л)	кинетин - 1,0 мг/л
II	Мурасиге-Скуга	2,4-Д - 2 мг/л НУК (1 мг/л)	кинетин - 1,5 мг/л -
III	Мурасиге-Скуга	МС3+ 2,4-Д (2,5 мг/л) + НУК (1,5 мг/л)	кинетин - 2 мг/л

После стерилизации бутоны двух сортов роз, помещали на модифицированную среду для индукции, как представлено на рисунке 8 (Приложение 1).

Для дальнейшего культивирования и размножения эксплантов проводили подбор питательных сред для регенерации. В качестве испытываемых сред использовали стандартные МС среды, содержащие 2,4-Д, НУК (0,5 мг/л), а также кинетин.

Эффективность среды для каждого сорта определяли по количеству эксплантов.

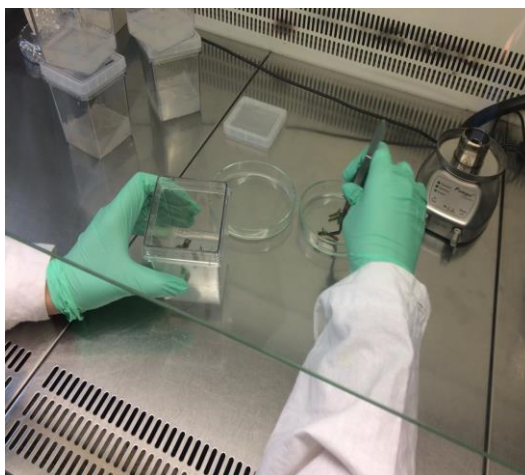


Рисунок 8 – Высадка эксплантов в питательную среду

При высадке и культивировании эксплантов изолированных зародышей сорта *Red Piano* на I среде, содержащей МС+ 2,4-Д (0,5 мг/л) + НУК (0,5 мг/л)+ кинетин (1,0 мг/л), в течении 4 недель процесса регенерации зародышей не отмечалось. Кроме того, через 28 дней культивирования на данном варианте среды отмечалось потемнение и усыхание эксплантов, как показано на рисунке 9.



Рисунок 9 – Сорт Red Piano в МС1

Для эксплантов сорта *Floribunda Pomponella*, культивируемых на среде I, также процесса регенерации зародышей в течении 30 дней не отмечалось

(рис.10). Кроме того, практически в то же время, что и у сорта *Red Piano*, через 27 дней культивирования на данном варианте среды было отмечено высыхание эксплантов, что говорит о том, что данный вариант среды является непригодным для введения роз двух голландских сортов *Red Piano* и *Floribunda Pomponella* в культуру *in vitro*.



Рисунок 10 – Сорт *Floribunda Pomponella* в MS1

Для эксплантов обоих сортов роз, культивируемых на втором варианте среды составом: MS + 2,4-Д (2 мг/л) + НУК (1 мг/л) + кинетин (1,5 мг/л) также был схожим. Экспланты обоих сортов роз показали хорошую приживаемость на данной среде.



Рисунок 11 - Сорт *Red Piano* в MS2

Для зародышей роз сорта *Red Piano*, помещенных на второй вариант питательной среды отмечалось явление регенерации уже на 3-ей неделе

культивирования, как мы можем заметить на рисунке 11. Кроме того, еще через 2 недели отмечалось появление значительного прироста.

Экспланты сорта роз *Floribunda Pomponella* также хорошо приживались и показывали нормальный уровень регенерации на среде ПМС уже на 3-4 неделе (рис. 12). Таким образом, на основании проведенного сравнения, можно утверждать, что состав среды ПМС обеспечивает нормальное развитие каллусов в отличие от первого варианта среды.

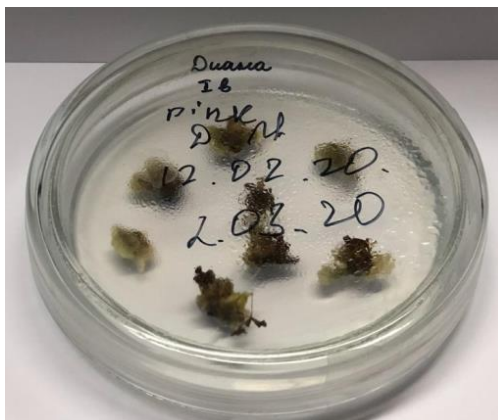


Рисунок 12 – Сорт *Floribunda Pomponella* в MS2

При переносе эксплантов роз на среду ПМС с содержанием 2,4-Д (2,5 мг/л) + НУК (1,5 мг/л) + кинетин (2 мг/л), был отмечен интенсивный рост и образование каллусов у эксплантов обоих сортов.



Рисунок 13 – Сорт *Floribunda Pomponella* в MS3

У сорта *Floribunda Pomponella* процесс образования регенерантов был отмечен через 14 – 17 дней после высадки эксплантов на среду (рис. 13). Для эксплантов зародышей сорта *Red Piano* процесс регенерации происходил несколько медленнее и начинался на 25-30 день (рис. 14). Таким образом, данный вариант среды также приводил к регенерации эксплантов, однако было отмечено, что далее, при культивировании регенерантов обоих сортов



роз в течении 2 недель на данной среде, все растения прекращали свой рост, чернели и погибали. Следовательно, данная среда не может быть использована для введения в культуру и регенерацию этих двух сортов роз.



Рисунок 14 – Сорт *Red Piano* в МС3

Таким образом, в ходе проведенных исследований нами подобраны 3 метода микроклонального размножения сортов роз и оптимизированы условия для культивирования и интенсивного размножения в условиях *in vitro* полученных микроклонов.

На основе экспериментальных данных установлено, что из всех 3 анализируемых сред наиболее эффективной для регенерации оказалась среда II МС, содержащая 2,4-Д (2 мг/л), НУК (1 мг/л) и кинетин (1,5 мг/л). На этой среде процент регенерации для всех сортов роз находился в диапазоне от 85 до 90 % от общего числа высаженных эксплантов.

На средах IМС и IIIМС с пониженным содержанием 2,4-Д, НУК и кинетина, отмечен средний процент инициации каллусов для всех сортов.

На среде IIIМС с высоким содержанием 2,4-Д, НУК и кинетина процент регенерации оказался самым низким для всех сортов.

Как показали наши предварительные исследования, индукция регенерации у эксплантов, выделенных из различных частей и органов растений не одинакова и зависит от сорта и концентрации фитогормонов. Разные сроки начала регенерации свидетельствует об индивидуальной чувствительности органов растений к гормонам.

Исходя из полученных результатов, для дальнейших экспериментов по инициации *in vitro* культур из эксплантов роз выбрана среда II МС, показавшая наилучшие результаты по введению в культуру и регенерации для обоих сортов исследуемых роз.

Оптимальные условия культивирования.

Культивирование проводили в климакамере, при температуре +20°C, фотопериод - 16/8 часов и освещенности – 36W/865. Через 30 - 45 дней на

данной среде наблюдали начало образования микропобегов у обоих сортов роз.

### 3.3 Адаптация растений-регенерантов

Существует множество схем перевода микрорастений в нестерильные условия. В современных лабораториях для успешной адаптации растений используется специальное оборудование, которое поддерживает влажность и температуру воздуха в заданном режиме, а также степень аэрации почвенного субстрата. При отсутствии специально оборудованных климатических камер под тенью полиэтиленовой пленки устанавливают ящики или горшки с грунтовым субстратом или используют полиэтиленовые пакеты, которыми накрывают стандартные торфяные горшки.

Принимая во внимание тот факт, что перевод пробирочных растений (*in vitro*) в условия, приближенные к естественным (*ex vitro*), и их дальнейшая адаптация к температурному, световому и водному режимам является серьезным стрессовым фактором, адаптацию растений-регенерантов подбирают для каждого сорта растений индивидуально.

На первых этапах адаптации пробирочные растения-регенеранты обоих сортов роз были пересажены в индивидуальные бумажные стаканчики с автоклавированной почвенной смесью (торф - земля - песок в соотношении 1:1:0,1). Для этого растения-регенеранты извлекались из среды, корни тщательно отмывались в 0,01%-м растворе перманганата калия, далее растения были пересажены на асептическую почву (рисунок 15). Растения в стаканчиках помещались в небольшие пленочные укрытия (минитеплицы), что позволяло поддерживать высокую влажность воздуха в районе подземных частей растений. Культивирование проводили в стандартных условиях, приближенных к естественным -16 часовой фотопериод, при температуре 25 С<sup>0</sup>, 70-75 % влажности. Через неделю культивирования в пленочном покрытии проделывались отверстия для снижения влажности и осуществления воздухообмена между внутренней и внешней средой. За этот период недоразвитые устьица растений-регенерантов начинали адаптироваться к условиям и приходили в нормальное рабочее состояние, позволяющее осуществлять растениям полноценный газообмен. В течении следующих 2 недель постепенно увеличивали диаметр отверстий вплоть до полного снятия защитной пленки. Увлажнение почвы производили регулярно, не допуская пересыхания почвы и корней. Температуру воздуха понижали до 22 С<sup>0</sup>.

На втором месяце адаптации растения выращивали без создания особых условий (свет, влажность). На этапе адаптации к почвенным условиям молодые растения регулярно поливали, так как на приживаемость растений отрицательно влияют пересыхание почвы и кратковременное

переувлажнение. Выживаемость растений считалась положительной при появлении новых листьев. Для оценки динамики роста адаптированных растений определяли высоту и количество листьев, образующихся у роз.



Рисунок – 15 - Пересадка в почву в бумажные стаканчики;

По результатам проведенного этапа адаптации было установлено, что наибольшей выживаемостью и способностью к адаптации отличались растения-регенеранты сорта *Floribunda Pomponella*. Процент выживаемости которых составил 87, по сравнению с растениями сорта *Red Piano*, процент выживаемости которых был несколько ниже и составил 82%.

Таким образом, в ходе проведенных исследований нами были исследованы 3 варианта сред с различным составом и оптимизированы условия для получения, культивирования и интенсивного размножения большого количества растений из зародышей роз методом интенсивной регенерации в условиях *in vitro*, проведен этап первичной адаптации, полученных растений регенерантов без создания стерильных условий на почве.

Установлено, что применение метода размножения незрелыми зародышами для клонального микроразмножения, обеспечивает получение качественного растительного материала и позволяет увеличить коэффициент его размножения в условиях *in vitro* для дальнейшего культивирования и селекции этого вида с целью сохранения и обогащения биологического разнообразия Казахстана.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сорта роз, используемые в нашей стране для дизайна ландшафта, характеризуются низким коэффициентом размножения, быстрым вырождением, высокой поражаемостью различными заболеваниями и высокой рыночной стоимостью. Наиболее успешными подходами к решению этой проблемы является использование современных биотехнологических способов размножения растений, и в частности, культура клеток *in vitro* и микроклональное размножение растений-регенерантов.

Современные биотехнологические методы - соматическая гибридизация, клеточная селекция, генно-инженерные эксперименты в корне меняют процесс селекции для работы по выведению новых высокопродуктивных сортов культурных растений. Перспективные в этом контексте биотехнологические методы культивирования *in vitro* зародышевых каллусов привлекли внимание исследователей с 60-х годов прошлого века. На сегодняшний день накоплено достаточно большое количество экспериментальных данных по различным аспектам культивирования *in vitro*. Подавляющее большинство исследований в этой области посвящено оценке физиологических условий выращивания, таких как состав и pH питательных сред, освещенность, температура [31].

В то же время успех этой биотехнологии, заключающийся в массовом и стабильном производстве полноценной плодородной регенерации растений, в значительной степени зависит от совершенствования и оптимизации всех ее этапов, а также на основе комплекса эмбриологических и цитофизиологических данных.

В ходе проведенных экспериментов, было установлено, что оптимальными эксплантами для получения первичной *in vitro* культуры роз оказались зародыши, взятые из бутонов роз. Анализ трех вариантов стерилизации растительного материала позволил отобрать наиболее оптимальные условия стерилизации для каждого сорта роз.

Был проведен подбор наиболее эффективного состава питательных сред для каждого сорта исследуемых роз и определены оптимальные условия для культивирования эксплантов, при введении их в культуру *in vitro*.

Отработан и оптимизирован метод микроклонального размножения для получения и культивирования эксплантов роз путем интенсивной регенерации. В соответствии с целью работы в культуру *in vitro* были введены два исследуемых сорта пионовидных роз.

В соответствии с поставленными задачами исследования были получены следующие результаты:

1. Выбран исходный растительный материал из двух сортов роз (*Red Piano* и *Floribunda Pomponella*) на пригодность использования в качестве экспланта для введения в условиях *in vitro*. Установлено, что оптимальными для этой процедуры являются незрелые зародыши, взятые из бутонов роз;

2. Подобраны оптимальные условия стерилизации эксплантов из бутонов роз сорта *Red Piano*. Выявлены особенности проведения стерилизации (обработка 10% гипохлоридом калия и продолжительность обработки перманганатом калия до 3х минут – третий вариант стерилизации), которые повышают долю стерильных эксплантов до 85 процентов.

3. Подобраны оптимальные условия стерилизации эксплантов из бутонов роз сорта *Floribunda Pomponella* (обработка 15% гипохлоридом калия и продолжительность обработки перманганатом калия до 2х минут – третий вариант стерилизации), которые повышают долю стерильных эксплантов до 90 процентов.

4. Впервые проведен подбор наиболее оптимальной питательной среды для введения в культуру *in vitro* незрелых зародышей роз двух сортов голландской селекции. Из трех сред, анализируемых в эксперименте, наиболее эффективной для регенерации является среда МС2, содержащая 2,4-Д (2 мг/л), НУК (1 мг/л) и кинетин (1,5 мг/л);

5. Анализ данных о динамике роста показателей у адаптированных растений роз к нестерильным условиям показал, что скорость роста побегов значительно возрастает у растений через месяц после пересадки в нестерильные условия.

Таким образом, в работе отобраны экспланты незрелых зародышей двух сортов роз, оптимизированы условия стерилизации и состав питательных сред для введения в культуру *in vitro* и получения жизнеспособных растений-регенерантов роз сортов *Red Piano* и *Floribunda Pomponella*.

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертационной работе используются следующие термины с соответствующими определениями:

Эксплант – фрагмент растения, используемый для получения первичного каллуса;

Клеточная культура – фрагмент ткани или полученная из первичного экспланта культура тканей;

Меристема – это образовательная ткань с незаметными, активно делящимися клетками;

Фитогормоны – (гормоны растений) – биологически активные соединения, образующиеся в растениях в малых количествах, которые активируют рост и развитие растений;

Ауксины – это фитогормоны, которые активируют рост стеблей и корней, и образование корней у проростков;

Цитокинины – фитогормоны (кинетин, 6-БАП), активизирующие развитие меристем, стимулирующие образование почек;

Микроразмножение – метод, основанный на вегетативном размножении растений в культуре *in vitro*.

## ОБОЗНАЧЕНИЯ

МС	- питательная среда Мурасиге-Скуга
ИУК	- индолилуксусная кислота
НУК	- $\alpha$ -нафтилуксусная кислота
ИМК	- индолилмасляная кислота
TDZ	- тидиазурон

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Стрелец В.Д. Агафонов Н.В. Методические рекомендации по селекции *Rosa L.*: Для студентов и аспирантов плодовошного факультета МСХА. // ТСХА, НПО Всерос. НИИ лекарств. Растений М., Изд-во МСХА, 1994. – С. 15
2. Жмылев П.Ю., Карпухина Е.А. О вегетативных малолетниках // Успехи экологической морфологии растений и ее влияние на смежные науки — М.: Наука, 1994.- С. 14-17.
3. Тарасенко М.Т., Прохорова З.А. Новиков П.Г., Интенсификация технологии зелёного черенкования декоративных культур в условиях Южного берега Крыма // Изв. ТСХА. 1977. Вып. 6. с. 80-98.
4. Мамадризохонов А.А., Коровин С.Е. О калусообразовании видов рода *Rosa L.* // V съезд физиологов растений России: Тез. док. -М. 1999 Т.2.-С. 432-434.
5. Сурина Е.И., Сурина О.Б. Розы. // «Олма-Пресс Звёздный Мир». М. 2002.
6. Бутенко Р. Г. Биология культивируемых клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе, Монография. — Москва, ФБК-Пресс, 1999. — 159 с.
7. Калинин Ф.Л., Кушнер Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений // Киев. Наукова Думка. -1992. - С. 80-84.
8. Nishiushi Y. studies on vegetative propagation of tulips. II Formation and development of adventitious buds in the excised bulb scale cultured in vitro. Soc. Hort. Sci.- 1979.- 48(1). - P. 92-105.
9. Тимофеева О.А., Невмержицкая Ю.Ю. Микрклональное размножение растений // Учебно-методическое пособие. — Казань: Казанский университет, 2012. — 45-47 с.
10. Куликов И.М. (рук.) и др. Инновационные технологии возделывания земляники садовой // Научно-практическое издание. М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2010. – С.38-50.
11. Тезекбаева Б.К., Малахова Н.П., Галиева Л.Д., Калиева А.А. Метод ускоренного размножения голландских тюльпанов в условиях *in vitro*. 18 Межд. Пуцинская школа-конф. молодых ученых "Биология-наука XXI века" - 21-25 апреля . - 2014. – С.44.
12. Курманкулов Н. Б., Дубровина К. А., Ержанов К. Б., Пралиев К. Д., Лесова Ж. Т., Жардемали Ж. К., Султанбаева А. С., Хасейн А., Егизбаева Т. К., Халымбетова А. Е., Чыкабаева А. Б., Синтез и оценка влияния некоторых производных пиперидин-4-онов на морфогенез растений *in vitro* и *in vivo* // Химический журнал Казахстана. – Алматы, 2007. – С.247-251.
13. Высоцкий В. А. Культура изолированных тканей и органов плодовых растений: оздоровление и микрклональное размножение //



Сельскохозяйственная биология: Ежемесячный научно-теоретический журнал. М., 1983. № 7. С. 39-41.

14. Болвелл Г.П., Вуд К.Р., Гонзалес Р.А., Данвелл Дж. М. и др. // Биотехнология растений: культура клеток. / М.В.О.Агропромиздат. - 1989. - С.10-117

15. Фаустов В. В., Жаркова И. В., Олешко Е. В., Асадулаев З. М., Шарафутдинов Х. В., Исмаил Х. Микроклональное размножение вишни // Известия ТСХА. М., 1989. Выпуск 5.-С. 129–135.

16. Национальный доклад РК о биологическом разнообразии. – Астана, 2010.- С.51, 95..

17. Загоскина, Н.В. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина. - М.: ИЗД-ВО "ОНИКС", 2003. - 496 с.

18. Morel G. M. La culture in vitro du meristeme apical de certaines orchidees // С. r. Acad. Sci. 1963. – Vol. 256. – PP. 4955-4959.

19. Бутенко Р. Г. Физиология клеточных культур, состояние и перспективы // Физиол. раст. 1978. - Т. 25, вып. 5. - С. 1009-1024.

20. Antonelli, M., Druart, P.H., 1990. The use of a brief 2,4-D treatment to induce leaf regeneration on *Prunus canescens*. Bois Acta Hortic., 280:45– 50.

21. К. Л. Сушков, М. В. Бессчетнова, 1958. Розы.- Алма-Ата: Кайнар, 1973. – С.112

22. Чоркинэ Н., Седченко М. Особенности микроклонирования *in vitro* редкого растения *Lilium Martagon L.* // Вестник Киевского Национального Университета. - 2009. - С.157-158.

23. Иващенко А.А. Тюльпаны и другие луковичные растения Казахстана. – Алматы. - 2005. - 192 с.

24. Podwyszynska M., Ondrej Novak, Karel Dolezal, Miroslav Strnad. Endogenous cytokinin dynamics in micropropagated tulips during bulb formation process influenced by TDZ and 2iP pretreatment // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2014. – PP. 331-346.

25. Chakrabarty D, Mandal AK, Datta SK. In vitro propagation of rose cultivars. Ind J Plant Physiol 2000. – vol. 5(2). – PP. 189–92.

26. Дунаева С.Е., Ковалева О.Н., Голубева Е.А., Москалева Г.И., Козырева О.Г. Способность незрелых зародышей к образованию растений-регенерантов в культуре *in vitro* у ранне- и позднеспелых сортов ячменя. Морфологическая дифференциация зародышей как показатель компетентности их клеток к регенерации растений // Физиол. раст. 2000. — Т. 47, вып. 1. - С. 58-64.

27. Егорова Н. А., Бугара А. М. Регенерация растений в культуре ткани кориандра и герани // Биология культивируемых клеток и биотехнология. — Новосибирск, 1988. - Т. 2. - С. 276-277.

28. Дубовицкая Л.А., Расторгуев С.Л. Культура изолированных зародышей в связи с отдаленной гибридизацией косточковых плодовых растений // Тр. ЦГЛ. 1984.-Т. 46, вып. 1. - С. 74-81.

29. Fari M., Csillery G., Zatuke L. Embryo culture an efficient techniqe in interspecific hybridization and in breeding of pepper (*Capsicum*) Genetics and freeding of capsicum. – 1983. – PP. 31-37.
30. Chandler J. M., Beard V.H. Embryo culture of *Heliathus* hybrids. Crop Sc. 1983. – Vol. 23(5). – PP. 1004-1007.
31. Суханов В.П., Папазян Н.Г. Условия получения каллуса и регенерантов в культуре зрелых зародышей пшеницы // Апомиксис и цитоэмбриология растений. Саратов. 1983. - Вып. 5. - С. 124-130.
32. Папазян Н.Г. Культура зародышей и стеблевых узлов некоторых сортов ячменя. // Апомиксис и цитоэмбриология растений. Саратов. 1983. - Вып. 5.-С. 142-151
33. Дубовицкая Л.А., Расторгуев С.Л. Культура изолированных зародышей в связи с отдаленной гибридизацией косточковых плодовых растений // Тр. ЦГЛ. 1984.-Т. 46, вып. 1.-С. 74-81.
34. Здруйковская-Рихтер А.И. Изолированные зародыши *Ficus afganistanica* W. в культуре *in vitro* II Бюлл. ГБС. 1997. Вып. 175. - С. 132— 137.
35. Здруйковская-Рихтер А.И., Орехова В.П., Тарасюк Т.М. Итоги селекции черешни с использованием эмбриокультуры *in vitro* II Бюлл. ГБС. 1997.-Вып. 175.-С. 137-141.
36. Khalid N, Davey MR, Power JB. An assessment of somaclonal variation in *Chrysanthemum morifolium*: the generation of plants of commercial value. *Sci Hort* 1989. – vol. 38. – PP. 194-287.
37. Jordan M.C., Larter E.N. Somaclonal varuation in triticales (X *Triticosecale* Wittmack) cv. Carman. *Canad. J. Genet. Cytol.* 1985. – Vol. 27. № 2. – PP. 151-157.
38. Гольшкин Л. В., Перчуляк Л. П., Чалык Л. В. Морфогенез в культуре тканей кукурузы // Биология культивируемых клеток и биотехнология. — Новосибирск. 1988. Т. 2. - С. 333-334.
39. Ахметова А.Ш., Миронова Л.Н. Особенности размножения и регенерации тюльпанов *in vitro* // Матер. Всерос. научн. конф. «Ботанические исследования в Поволжье и на Урале». Бюллетень Ботанического сада СГУ.- № 7– Саратов, 2008. – С. 174-177.
40. Zonneveld B. J. M. The systematic value of nuclear DNA content for all species of *Narcissus* L. (*Amaryllidaceae*) // *Plant Syst. Evol.* – 2008. – P – 235.
41. Баранова М.В. Лилии. - Л.: Наука, 1990. - 384 с.
42. Блукет Н.А. Ботаника с основами физиологии растений и микробиологии / Н.А. Блукет, В.Т. Емцев. – М. Колос, 2007. – 480 с.
43. Бумбеева Л. И., "Розы" - Москва, Издательство «Кладезь-Букс», 2010. – С. 61-70.
44. Роза Ред пиано (Red piano). URL: <http://sortoved.ru/roza/roza-red-piano-red-piano.html>
45. Роза флорибунда Помпонелла. URL: <https://abekker.by/product/roza-floribunda-pomponela>

46. Podwyszynska M., Sochacki D. Micropropagation of Tulip // Production of Virus-Free Stock Plant. - Methods Mol. Biol.- 2010.- 589.- P. 243-255.
47. Шевелуха В.С. Сельскохозяйственная биотехнология: Учеб. /, В.С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, С. В. Дегтярев – М.: Высшая школа, 1998. – 290 с.
48. Малахова Н. П., Ахметова Д.М. «Особенности микроклонального размножения растений, полученных из изолированных зародышей в условиях *in vitro*» // Труды Сатпаевских чтений «Сатпаевские чтения-2020», том II, – 2020. – С. 541-543
49. Малахова Н. П., Ахметова Д.М. «Получение растений-регенерантов роз из изолированных зародышей в условиях *in vitro*» // Международная научная конференция «ФАРАБИ ЭЛЕМИ», – 2020. – С. 275

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

### Состав питательной среды Мурасиге-Скуга

Компоненты	Концентрация в среде для культивирования, мг/л
Макросоли:	
$\text{KNO}_3$	1900
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	370
$\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$	440
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
Микросоли:	
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	16,9
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	2,3
$\text{KI}$	0,83
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	557
$\text{Na}_2\text{EDNA} \times 2\text{H}_2\text{O}$	747
Витамины:	
Тиамин-НСl	0,1
Никотиновая кислота	0,5
Пиродоксин-НСl	0,5

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2

### Состав питательной среды Мурасиге-Скуга 1 для инициации и размножения

Компоненты	Концентрация в среде для культивирования, мг/л
Макросоль	100
микросоль	10
Fe-хелат	5
витамины	5
Сахароза	20,000
НУК	0,5
Кинетин	1,0
2,4Д	0,5
агар	6,000

### ПРИЛОЖЕНИЕ 3

#### Состав питательной среды Мурасиге-Скуга 2 для инициации и размножения

Компоненты	Концентрация в среде для культивирования, мг/л
Макросоль	100
микросоль	10
Fe-хелат	5
витамины	5
Сахароза	20,000
НУК	1
Кинетин	1,5
2,4Д	2
агар	6,000

## ПРИЛОЖЕНИЕ 4

### Состав питательной среды Мурасиге-Скуга 3 для инициации и размножения

Компоненты	Концентрация в среде для культивирования, мг/л
Макросоль	100
микросоль	10
Fe-хелат	5
витамины	5
Сахароза	20,000
НУК	1,5
Кинетин	2
2,4Д	2,5
агар	6,000