

81% 2,4,5-Т за 9 дней. Среди метаболитов были выявлены 2,4-дихлорфеноксиуксусная, 4-хлорфеноксиуксусная и 3-метил-2,6-диоксо-4-гексеновые кислоты. Степень очистки почвы, достигаемая при использовании штамма *G. oxydans* 2Т, составила 66,5% к 48-м суткам.

The strain *Gluconobacter oxydans* 2Т has been isolated from a soil mixed bacterial populations. *G. oxydans* 2Т is capable of utilizing 2,4,5-Т as the sole source of carbon and energy. 2,4,5-Т quantity was reduced in a culture medium approximately on 81% by *G. oxydans* 2Т batch culture within 9 days. The strain produced processes of 2,4,5-Т dehalogenation to phenoxyactic acid, which then was transformed to 3-methyl-2,6-dioxo-4-hexenoic acid. The culture *G. oxydans* 2Т utilizes 2,4,5-Т in soil. The 2,4,5-Т concentration was reduced approximately on 67% within 48 day.

ИВАНОВА Н.Н., МИТРОФАНОВА И.В., МИТРОФАНОВА О.В.

Никитский ботанический сад - Национальный научный центр, Украина, 98648, АР Крым, г. Ялта, нгт. Никита, e-mail: in_vitro@ukr.net

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ПЕРСПЕКТИВНЫХ СОРТОВ *BEGONIA RIGER ELATIOR*

Род бегония (*Begonia* L.) относится к семейству бегониевых (*Begoniaceae* С.А. Agardh.) и насчитывает около 1000 видов и разновидностей. Растения бегонии обладают большим разнообразием форм окрасок листьев и цветков, а также обильным и продолжительным цветением. Основной способ вегетативного размножения — черенкование. Для этих целей используют побеги, листья и его фрагменты. В цветоводстве в настоящее время получили распространение около 130 видов и около 2000 гибридов [1]. Исходя из биологических особенностей и использования, формы и сорта бегонии делят на две группы: красивоцветущие и декоративно лиственные. Бегония элатиор (*Begonia x elatior*, *B. hiemalis*), относящаяся к красивоцветущим бегониям — гибридная форма, которая получена в результате скрещивания *B. tuberhybrida* и *B. socotrana*. В Германии были созданы крупноцветковые мелколистные сорта, получившие название раса элатиор-Ригера или *Begonia riger elatior*.

О возможности клонального микроразмножения *Begonia x elatior* с использованием различных эксплантов, таких как верхушки побегов, сегменты цветоножки, ткани цветоноса и цветков, сегменты чашелистиков, лепестков, черешков, стеблевых отрезков описано в ряде публикаций [2–7]. Однако отсутствие универсальной питательной среды, обеспечивающей регенерацию разных сортов, создает определенные трудности при разработке способов клонального микроразмножения данной культуры.

Целью настоящего исследования было изучение особенностей регенерации растений пяти сортов *B. riger elatior* в условиях *in vitro* для разработки

биотехнологических приемов клонального микроразмножения и последующего тиражирования и сохранения ценных генотипов.

Материалы и методы

В опытах использовали растения *B. riger elatior* сортов Krefeld, Schwabenland, Nixi red и Nixi rose, Lorrenie. В работе придерживались общепринятых методов культуры изолированных клеток, органов и тканей растений [8–10]. Для стерилизации растительных эксплантов применяли 70%-ный C_2H_5OH (1 мин) и 1%-ный раствор $NaClO$ (10 мин). Сегменты соцветий *B. riger elatior* культивировали на модифицированных питательных средах, содержащих макроэлементы по Кнопу [11], микроэлементы по Буржен-Ничу [12], дополненных 54,35 мкМ аденинсульфата, 3% сахарозы, 0,8% агара. В качестве регуляторов роста использовали ауксины: 0,54–2,69 мкМ НУК, 5,71–11,42 мкМ ИУК и цитокинин БАП в концентрации 4,40–13,30 мкМ. Колбы и пробирки с эксплантами помещали в климатическую камеру с температурой 21–29 °С, 12–20-часовым фотопериодом, интенсивностью освещения 2–3 клк, относительной влажностью воздуха 70%. Индукцию ризогенеза у микророзеток *B. riger elatior* в культуре *in vitro* осуществляли на агаризованной питательной среде МС [13], содержащей 2,95–7,36 мкМ ИМК. Полученные регенеранты адаптировали на СУВРe, а затем переносили в теплицу.

Результаты и обсуждение

Изучение особенностей морфогенеза *in vitro* является необходимым условием успешного микроразмножения растений *B. riger elatior*. Морфогенез растений находится под действием ряда факторов [8, 9]. Формирование адвентивных микропобегов может происходить непосредственно из клеток экспланта или из образующегося в результате дедифференциации первичного каллуса.

В процессе исследований стерильные экспланты — сегменты соцветий исследуемых сортов длиной 12 мм помещали на агаризованную питательную среду, в состав которой были включены макроэлементы по прописи Кнопа, микроэлементы по Буржен-Ничу и дополненную регуляторами роста, сахарозой, аденин сульфатом. Через 4–5 недель культивирования на эксплантах активно формировался морфогенный каллус. Следует отметить, что активную индукцию каллусообразования наблюдали в пазухах прицветников и на базальных частях цветоножки, особенно у молодых соцветий. В процессе исследований установлено влияние регуляторов роста на индукцию каллусогенеза *B. riger elatior* исследуемых сортов. Так, каллус образовывался из сегментов соцветий во всех вариантах опытов. Максимальная частота каллусообразования была отмечена на агаризованной питательной среде, дополненной 2,69 мкМ НУК и 13,30 мкМ БАП. Наличие в питательной среде цитокинина в отсутствии ауксинов вызывало снижение частоты индукции образования каллуса в 2–3 раза. При этом увеличение концентрации НУК приводило к замедлению образования адвентивных почек и микророзеток в культуре сегментов соцветий *B. riger elatior*. В результате проведения экспериментов

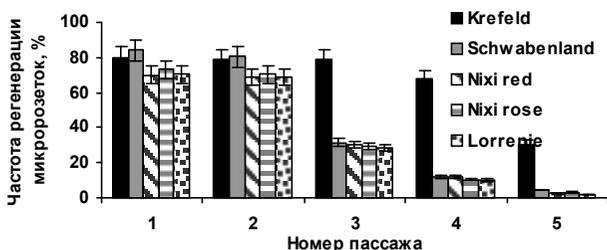


Рис. Влияние количества пассажей на частоту регенерации микророзеток в культуре каллуса *B. riger elatior*

с различными концентрациями БАП на фоне постоянных концентраций НУК (2,69 мкМ) и ИУК (1,14 мкМ) было выявлено, что применение БАП в концентрации 2,20–4,40 мкМ в среде активно индуцировало развитие адвентивных почек и микророзеток в каллусной культуре *B. riger elatior*.

Известно, что каллусные клетки можно длительное время культивировать в условиях *in vitro*, но при этом в них обычно возникают цитогенетические изменения [14]. В наших экспериментах для снижения уровня соматической изменчивости период роста каллуса ограничивали 3–4 пассажами. Так, средняя частота регенерации микророзеток из каллуса 1-го пассажа сортов Krefeld и Schwabenland составляла 80–84%, а у сортов Nixi red, Nixi rose и Lorrenie — 70–73%. У большинства исследуемых сортов *B. riger elatior* индукция регенерации микророзеток ограничивалась 1–2 пассажами (рис.).

У сорта Krefeld формирование адвентивных почек и микропобегов наблюдали до 3–4 пассажа. При более длительном культивировании после 5–7 пассажей отмечали образование аномальных нежизнеспособных микророзеток и снижение частоты регенерации. Спустя 2–3 недели культивирования каллуса формировались микророзетки с 2–4 листочками. Наличие в питательной среде наряду с БАП, НУК и ИУК 61,96 мкМ сульфата цинка и 2,89 мкМ ГК способствовало вытягиванию и росту микророзеток, а также их лучшему разделению для укоренения.

Наряду с трофическими и гормональными факторами на регенерацию растений *B. riger elatior* значительное влияние оказывали физические: интенсивность освещения, фотопериод и температура. Наиболее активно процессы морфогенеза в культуре изолированных сегментов соцветия происходили на свету. В отсутствии или при слабом освещении (в пределах от 1 клк и ниже) отмечали замедление формирования морфогенного каллуса. В этом случае частота каллусогенеза в среднем составляла 35%. При интенсивности освещения от 2 до 3 клк в 88–96% исходных эксплантов изучаемых сортов формировали морфогенный каллус. При 4–5 клк наблюдали резкое снижение частоты каллусообразования. Изучение влияния температуры и продолжительности освещения на регенерационные процессы в каллусе показало, что непрямой органогенез в культуре сегментов соцветий *B. riger elatior*

**Влияние физических факторов культивирования на регенерационный потенциал
эксплантов *B. riger elatior***

Температура, °С	Среднее количество эксплантов, образовавших микророзетки, %	Фотопериод, ч	Среднее количество эксплантов, образовавших микророзетки, %
21	49,8 ± 2,5	12	56,4 ± 2,8
23	83,4 ± 3,7	14	72,4 ± 4,6
25	96,2 ± 4,9	16	96,2 ± 4,7
27	66,3 ± 4,5	18	67,3 ± 4,6
29	40,4 ± 3,6	20	52,4 ± 2,7

всех исследуемых сортов активно происходил при 23–25 °С и 16-часовом фотопериоде (табл.). Уменьшение или увеличение фотопериода и температуры культивирования вызывало уменьшение количество эксплантов, образовавших микророзетки.

Проведенные эксперименты показали, что коэффициент размножения зависел не только от состава питательной среды и освещенности, но и от сортовых особенностей культуры. При соблюдении равных условий культивирования *in vitro* активно развивались сорта Krefeld и Schwabenland (красные, не махровые). Активность регенерации микророзеток была ниже у сортов Nixi red и Nixi rose (с махровыми цветами); среднее количество микророзеток на эксплант составляло 30,2±5,2 шт. у сорта Krefeld, 31,3±1,7 шт. у сорта Schwabenland, 27,9±1,2 шт. у сорта Nixi red, 26,6±1,2 шт. у сорта Nixi rose и 21,3±2,7 шт. у сорта Lorrenie.

Для индукции ризогенеза использовали вещества ауксинового типа действия (ИМК, НУК и ИУК) в различных концентрациях. Микророзетки *B. riger elatior* переносили на среду МС. 100%-ное укоренение микророзеток наблюдали в присутствии 2,95–7,36 мкМ ИМК. Через 14 суток среднее количество корней достигало 4,15 ± 1,2 шт. на эксплант, а их средняя длина — 2,51±1,2 см.

На этапе адаптации *in vivo* полученные миниатюрные растения высаживали в вазоны, наполненные смесью торфа и перлита в соотношении 2:1. Использование стерильных субстратов позволило увеличить частоту приживаемости растений в условиях *in vivo* до 95%. В первые сутки адаптации растения выдерживали в условиях повышенной влажности (80–90%), а через 2 недели при относительной влажности 70%. Длительность периода адаптации составила 2 месяца.

Выводы

Разработаны биотехнологические приемы клонального микроразмножения пяти сортов *B. riger elatior* через непрямо́й органогенез. Полученные результаты могут быть использованы в практической селекции с целью размножения ценных генотипов, тиражирования изученных сортов *B. riger elatior* и их сохранения в условиях *in vitro*.

Литература

1. Шахова Г.И. Бегониевые.— М.: Планета, 1987.— Сер. Комнатные растения, Вып.3.— 60 с.
2. Bigot C. Multiplication vegetative *in vitro* de *Begonia hiemalis* (Rieger et Schwabenland): I. Methodologie // Agronomie.— 1981a.— V.1.— P. 433–440.
3. Jain S.M., Brar D.S., Ahloowalia B.S. Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement // Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Acad. Publ., 1998.— P. 603.
4. Mikkelsen E.P., Sink K.C. *In vitro* propagation of rieger Elatior Begonias // Hort Science.— 1978.— V.13.— P. 242–244.
5. Reuter G., Bhandari N.N. Organogenesis and histogenesis of adventitious organs induced on leaf blade segments of *Begonia elatior* hybrids (*Begonia hiemalis*) in tissue culture // Gartenbauwissenschaft.— 1981.— B.46.— S. 241–249.
6. Welander T. *In vitro* organogenesis in explants from different cultivars of *Begonia hiemalis* // Physiol Plant.— 1977.— V.41.— P. 142–145.
7. Митрофанова О.В., Иванова Н.Н. Микроразмножение бегонии Элатиор // Цветоводство.— 1986.— №6.— С. 12–13.
8. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений.— М.: Наука, 1964.— 272 с.
9. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений.— К.: Наукова думка, 1980.— 488 с.
10. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Смыков А.В., Лесникова Н.П. Методы биотехнологии в селекции и размножении субтропических и косточковых плодовых культур // Интенсификация селекции плодовых культур: Сб. науч.тр. ГНБС.— 1999.— Т.118.— С. 189–200.
11. Knop W. Quantitative Untersuchungen uber di Ernahrungsprozess der Pflanzen // Land.Vers. Sta.— 1865.— V.7.— P. 93.
12. Bourgin J.P., Nitsch J.P. Obtention de *Nicotiana* haploides apartir detamines cultivees *in vitro* // Ann. Physiol. Veg.— 1967.— V.9, N4.— P. 377–382.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays tobacco tissue culture // Physiol. Plant.—1962.— 15, №3.— P. 473–497.
14. Фролова Л.В. Особенности популяции культивируемых клеток // Культура клеток растений.— М.: Наука, 1981.— С. 5–16.

Резюме

На основі даних досліджень показано можливість одержання регенерантів п'яти сортів *B. riger elatior*. Визначені оптимальні концентрації регуляторів росту в поживному середовищі, фізичні фактори культивування, що впливають на процеси регенерації рослин. Вивчені умови утворення коренів у мікророзеток *in vitro* і адаптації рослин *in vivo*.

На основе данных исследований показана возможность получения регенерантов пяти сортов *B. riger elatior*. Определены оптимальные концентрации регуляторов роста в питательной среде, физические условия культивирования, влияющие на процессы регенерации растений. Изучены условия укоренения микророзеток *in vitro* и адаптации растений *in vivo*.

The possibility of regenerants obtaining from 5 cultivars of *B. riger elatior* has been shown on the base of researches' data. The optimal concentrations of growth regulators in culture medium, physical factors of cultivations, influenced on the process of plants regeneration have been determined. The conditions of microrosettes rooting *in vitro* and plants adaptation *in vivo* have been studied.

ИННЮТКИНА А. Г., ЕГОРОВА Н. А.

*Институт эфиромасличных и лекарственных растений УААН,
АР Крым, 95493, Симферополь, ул. Киевская, 150, e-mail: artemisiadr@gmail.com*

ИНДУКЦИЯ КАЛЛУСО- И МОРФОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ОРГАНОВ ПОЛЫНИ ЭСТРАГОН

В настоящее время в селекции большинства эфиромасличных и лекарственных растений используются в основном традиционные методы гибридизации и отбора. Повысить эффективность селекционного процесса возможно за счет применения биотехнологических подходов, и в частности, таких клеточных технологий как получение соматональных вариантов, клеточная селекция, мутагенез *in vitro*. Использование этих методов позволяет расширить уровень генетической гетерогенности исходного селекционного материала и получить ценные генотипы. Одним из сложных этапов многих клеточных технологий является индукция морфогенеза в культуре каллусных тканей. Вторичная дифференциация, которая ведет к регенерации растений путем соматического эмбриогенеза или органогенеза, зависит от многих факторов. Среди них наиболее важными являются генотип исходного растения, состав питательных сред и условия культивирования *in vitro* [2]. Высокий уровень генетической детерминированности процессов морфогенеза обуславливает необходимость эмпирическим путем для каждого вида или даже сорта оптимизировать условия культивирования каллусных тканей и регенерации из них растений.

На территории Крымского полуострова произрастает 14 видов полыни, из них 6 отнесены к перспективным для селекционной работы, к их числу относится и полынь эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.) [4]. Эстрагон широко применяется в пищевой промышленности при приготовлении маринадов и солений, а также в медицине для повышения аппетита, лечения нарушений обмена веществ, заболеваний почек, цинги и других заболеваний.

В литературе имеются сведения об изучении каллусогенеза и морфогенеза у отдельных представителей рода *Artemisia* L. [3, 5, 6]. Данных об исследовании этих процессов у полыни эстрагон в доступной нам литературе не найдено. Поэтому для разработки клеточных технологий, способствующих повышению эффективности селекции этого ценного растения, актуальным является изучение влияния состава питательной среды, генотипа и типа экспланта на индукцию образования каллуса и регенерацию из него растений, что и явилось целью нашей работы.

Материал и методы

Объектом исследований служили селекционные образцы полыни эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.) из коллекции Института эфиромасличных и лекарственных растений УААН — №5р.24, №бр.17, и №7р.1, различающиеся по морфологии и составу эфирного масла. Первичный каллус получали, используя в качестве эксплантов фрагменты стебля, высечки листа и меристемы. Стерилизацию эксплантов проводили с использованием 70%