

МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ in vitro СУБТРОПИЧЕСКИХ, ДЕКОРАТИВНЫХ КУЛЬТУР И ЭНДЕМИКОВ ЗАПАДНОГО КАВКАЗА: ОРИГИНАЛЬНЫЕ И ОПТИМИЗИРОВАННЫЕ ПРОТОКОЛЫ**Т.М. КОЛОМИЕЦ, В.И. МАЛЯРОВСКАЯ, М.В. ГВАСАЛИЯ,
Л.С. САМАРИНА, Р.Н. СОКОЛОВ**

Получение качественного посадочного материала в цветоводстве и садоводстве связывают с необходимостью применять высокие технологии оздоровления и тестирования. Как известно, методы микроразмножения также широко используются селекционерами для ускоренной репродукции ценного материала и служат важным способом поддержания существующего биоразнообразия в случае с видами, занесенными в Красные книги. Однако для ряда цветочно-декоративных, и особенно субтропических плодовых культур, редких исчезающих видов растений дикой флоры еще не описаны надежные приемы получения и размножения растений-регенерантов in vitro. В настоящей работе представлены результаты разработки и усовершенствования методов микроклонального размножения чая *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, лимона *Citrus limon* (L.) Burm, камелии японской *Camellia japonica* L. и *Lilium caucasicum* Misch. ex Grossh. (исчезающий эндемичный вид Западного Кавказа). Для вышеперечисленных субтропических и декоративных растений выявлены особенности получения стерильной культуры и сезонные сроки (май-октябрь) их введения в культуру in vitro. Оптимизированы питательные среды и условия культивирования для микроклонального размножения изучаемых культур. Так, для чая культивирование эксплантов на питательной среде WPM (Woody Plant Media), дополненной фиторегуляторами 6-бензиламинопурином (6-БАП, 3,0 мг/л) и аденином (0,9 мг/л), способствовало индукции многочисленных адвентивных микропобегов. Активный рост микропобегов для камелии японской был отмечен также на питательной среде WPM с фиторегуляторами 6-БАП и индолил-3-уксусной кислотой (ИУК) в концентрации соответственно 2 мг/л и 0,5 мг/л. Для сортов лимона надежным способом размножения оказалась микропрививка. Выявлено, что после 3-го цикла микропрививки коэффициент размножения микрочеренков в 2 раза превышал аналогичный показатель для микропобегов из пазушных почек растений-доноров и составил 4,6 шт/побег. У *L. caucasicum* использование различных частей луковичных чешуй показало, что эффективность индукции морфогенеза in vitro зависела от того, какая часть использовалась в качестве экспланта. Через 48 сут в стерильных условиях из базальной и медиальной частей чешуй развивались преимущественно адвентивные побеги, реже происходил каллусо- и ризогенез, в то время как в культуре апикальных частей преобладал каллусогенез. В доступной литературе мы не нашли данных о возможности получения культуры тканей у *L. caucasicum*. Таким образом, нами впервые разработан протокол для размножения in vitro этого исчезающего эндемика Западного Кавказа.

Ключевые слова: ступенчатая стерилизация, клональное микроразмножение, микропобеги, микропрививка, чай *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, лимон *Citrus limon* (L.) Burm, *Camellia japonica* L., *Lilium caucasicum* Misch. ex Grossh.

В современном цветоводстве и садоводстве прослеживается четкая тенденция повышения требований к качеству посадочного материала и его сортименту, что связано с необходимостью использовать высокие технологии оздоровления и тестирования. Кроме того, сокращение сроков получения генотипов с хозяйственно ценными свойствами, ускорение их внедрения в производство, создание и содержание коллекций ценных форм также приоритетны для сельскохозяйственной науки (1).

Решению этих проблем может способствовать применение биотехнологических приемов, с помощью которых становится возможным в широких масштабах получать посадочный материал, свободный от вирусных, грибных и бактериальных болезней, вегетативное потомство у растений, которые трудно размножить в обычных условиях, быстро «тиражировать» ценные клоны сортов и гибридов, длительно хранить растительный материал в контролируемых лабораторных условиях (без контакта с экологическими факторами), осуществлять его международный обмен без риска занести карантинных вредителей, получать формы с измененной ploидно-

стью, соматоклональные варианты и трансгенные растения, поддерживать существующее биоразнообразие редких и исчезающих видов, занесенных в Красные книги (2, 3).

К таким эффективным биотехнологическим приемам получения, оздоровления, ускоренной репродукции сортов и гибридов цветочно-декоративных и плодовых растений относится микроразмножение. Однако для многих из них, в частности для субтропических плодовых культур, редких исчезающих видов дикой флоры пока что не предложены методы надежного получения и размножения растений-регенерантов *in vitro* из изолированных тканей и органов (4, 5).

В СССР работы по использованию клонального микроразмножения для оздоровления растений чая как одной из важнейших субтропических культур были начаты еще в 1980-х годах (6). Подобный подход становится все более актуальным в связи с сокращением сельскохозяйственных площадей, кроме того, впервые появляется возможность для сохранения уникальных генотипов чая в депонированной коллекции в условиях лаборатории. Следует отметить, что в отношении древесных видов сохраняется проблема культивирования *in vitro* в стерильных условиях. Например, у растений чая основное препятствие в получении асептической культуры — большое количество фенольных соединений (7, 8), содержащихся в молодых побегах, которые используются как экспланты. Еще одна проблема при клональном микроразмножении чая — получение активной растущей стерильной культуры (9).

Среди субтропических культур важное место занимают цитрусовые (10). В нашей стране первые работы по культивированию цитрусовых *in vitro* проводились также в 1980-х годах (11-13). Несмотря на то, что за рубежом работы по оптимизации протоколов культивирования цитрусовых *in vitro* многочисленны, до сих пор так и не удалось разработать эффективную методику микроразмножения сортового материала в культуре вегетативных почек (14-16).

Применение биотехнологических методов в отношении декоративных кустарников часто обусловлено тем, что они плохо размножаются вегетативно вследствие очень низкого процента укоренения черенков. В частности, подобное относится к высокодекоративным (имеющим махровые цветки) сортам камелии *Camellia japonica* L., произрастающим в условиях субтропиков России (17). На территории Большого Сочи одна из самых представительных коллекций высокодекоративных сортов камелии японской произрастает в Субтропическом ботаническом саду Кубани (г. Сочи), основой которой стали растения, привезенные из различных ботанических садов России и из-за рубежа (18).

Все шире применяются биотехнологии для сохранения флористического биоразнообразия, в частности для поддержания растений, численность популяций которых резко падает, а также уникальных слабоизученных форм, способных в будущем расширить и улучшить сортимент возделываемых культур. Созданием коллекций *in vitro* исчезающих и редких видов занимаются в Индии (19), США (20), Великобритании (21-24), Австралии (25) и в ряде других стран. С 2003 года во Всероссийском НИИ цветоводства и субтропических культур разрабатываются приемы для клонального микроразмножения некоторых уникальных для мировой флоры видов — местных эндемиков *Campanula longistyla* Fomin., *C. alliariaefolia* Willd., *C. latifolia* L., *C. taurica* Juz., *C. bzybica* (26), *Crocus speciosus* Bieb. (27). К одному из видов таких редких эндемиков Западного Кавказа, требующих сохранения, относится *Lilium caucasicum* Miscz. ex Grossh.

(*Liliaceae*) (27).

Цель проводимых нами исследований — разработка и совершенствование методов клонального микроразмножения и регенерации субтропических культур, декоративных растений и редких исчезающих представителей местной дикой флоры для ускорения селекции, производства оздоровленного посадочного материала и сохранения биоразнообразия.

Методика. Объектами исследования были растения чая *Camelia sinensis* (L.) Kuntze сорта Колхида и местной популяции, *Citrus limon* (L.) Burm сортов Новоафонский, Ударник, Бесколючий, *Camelia japonica* (L.) сортов Reine des Beantes, David Boschi и Duc de Bretagne, а также эндемичный вид флоры Западного Кавказа *Lilium caucasicum* Misch. ex Grossh.

Эксплантами для введения в культуру *in vitro* у *Camelia sinensis* служили апикальные и пазушные почки, отобранные на молодых активно растущих побегах текущего года в период с апреля по октябрь. На этапе пролиферации морфогенных структур чая были испытаны три варианта минеральных питательных сред — Мурасиге-Скуга (MS) (28), Гамборга В₅ (29) и WPM (Woody Plant Medium) (30). Микроразмножение *C. sinensis* проводили адвентивными побегами и частью побега с пазушной почкой на питательной среде WPM, дополненной 6-бензиламинопурином (6-БАП, 3 мг/л) и аденином (0,9 мг/л).

Для получения стерильной культуры *Camelia japonica* из апикальных и пазушных почек, также отобранных на молодых активно растущих побегах текущего года в период с апреля по октябрь, было испытано шесть вариантов обработки эксплантов. Варианты различались по набору и концентрации стерилизующих агентов, а также времени их воздействия: 1-й — 70 % этанол (1 мин), 20 % хлорная известь (5 мин), 15 % пероксид водорода (5 мин); 2-й — 70 % этанол (1 мин), 20 % хлорная известь (5 мин), 8,5 % пероксид водорода (3 мин); 3-й — 0,5 % новодез эком-50м (действующие агенты — 25 % хлорид алкилдиметилбензиламмония и поверхностно-активное вещество; производитель ОАО НПО «Новодез», г. Москва) (30 мин); 4-й — 0,2 % новодез (20 мин); 5-й — K₂MnO₄ (30 мин) + 70 % этанол (1 мин) + 0,2 %-й новодез (20 мин) + 5 % пероксид водорода (1 мин); 6-й — K₂MnO₄ (40 мин) + 96 % этанол (1 мин). После каждого стерилизующего раствора образцы трижды промывали дистиллированной водой в течение 10 мин. На этапе введения в культуру *in vitro* экспланты *C. japonica* культивировали на питательной среде WPM с фитогормонами 6-БАП (2,0 мг/л) и α -нафтилуксусной кислотой (НУК, 0,5 мг/л). Через 2-2,5 мес микропобеги пересаживали на питательную среду со следующим содержанием фитогормонов: 6-БАП — 2,5 мг/л, НУК — 0,5 мг/л и гибберелловая кислота (ГК₃) — 1,0 мг/л.

Получение микропривитых растений *Citrus limon* включало три этапа: выращивание привоев из пазушных почек, выращивание подвоев из семян лимона Мейера (*Citrus × meyeri* Meyer) и собственно прививка меристем, полученных от введенных в стерильную культуру пазушных почек. Пазушные почки цитрусовых стерилизовали в течение 25 мин 0,3 % желтоленом (ООО «НПО «ВЕЛТ», Россия); действующее вещество — клатрат четвертичного аммониевого соединения (дидецилдиметиламмоний) с карбамидом. Для получения привоя при культивировании пазушных почек *C. limon* использовали питательную среду MS с добавлением 6-БАП (0,1 мг/л) и НУК (0,5 мг/л). Культивирование подвоев и микропривитых растений осуществляли на питательной среде WPM, дополненной БАП (1 мг/л) и ГК₃ (2 мг/л). Микропрививки лимона проводили на подвой лимона Мейера (*Citrus × meyeri* Meyer) по методике L. Navarro (31) с модификациями

(4). У микропривитых растений динамику приживаемости тканей контролировали микроскопированием («ЛОМО», Россия).

В качестве эксплантов *Lilium caucasicum* использовали различные части чешуй луковиц, которые стерилизовали в 96 % этаноле 1 мин и далее в 2 % вельтолене 10 мин. В качестве первичных питательных сред использовали прописи MS и MS с половинным количеством минеральных солей ($1/2$ MS) и различными сочетаниями фитогормонов НУК, 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) (в концентрациях 1,0-2,0 мг/л) и 6-БАП (3 мг/л).

При подготовке питательных сред pH доводили до 5,7, после чего их автоклавировали в течение 20 мин при температуре 120 °С. Первичные экспланты и микропобеги культивировали при интенсивности освещенности до 5000 лк, 16-часовом фотопериоде и температуре 24 ± 1 °С.

Полученные данные обрабатывали по Б.А. Доспехову (32) с использованием программного обеспечения MS Office Excel.

Результаты. Основным этапом введения эксплантов в культуру *in vitro* была отработка режимов стерилизации растительных объектов. Для растений чая сорта Колхида и местной популяции из девяти протестированных вариантов эффективной оказалась ступенчатая стерилизация (последовательная обработка 20 % гипохлоритом натрия, 70 % этиловым спиртом и 0,2 % раствором диацита в течение соответственно 20, 30 и 25 мин).

Применение питательной среды MS (6) с добавлением 6-БАП (2,0 мг/л) и тетрациклина (1000 мг/л) оказалось наиболее эффективным для введения эксплантов чая в культуру *in vitro*. При культивировании растительных тканей на питательной среде Гамборга В₅ с гибберелловой кислотой (ГК₃ — 2,0 мг/л) происходило образование витрифицированных (сверхводных) микропобегов.

Пассирование эксплантов на среде WPM с концентрацией цитокининов 6-БАП 3,0 мг/л и аденина 0,9 мг/л способствовало активной индукции микропобегов растений чая, высота которых достигала в среднем 25,7 мм (табл. 1, рис. 1).

1. Влияние питательных сред и фитогормонов на рост и развитие *Camelia sinensis* (L.) в культуре *in vitro*

Питательная среда	Регулятор роста (концентрация)	Формирование микропобегов		Продолжительность культивирования, мес
		число, шт.	высота, мм	
MS	6-БАП (2,0 мг/л)	22	23,8±0,3	1,5-2
	Зеатин (0,5 мг/л)			
	Аденин (0,5 мг/л)			
	НУК (0,5 мг/л)			
Среда Гамборга (Г ₅)	6-БАП (2,5 мг/л)	5	18,4±0,2	2-2,5
	ГК ₃ (2,0 мг/л)			
	НУК (0,5 мг/л)			
WPM	6-БАП (3,0 мг/л)	32	25,7±0,4	1
	Аденин (0,9 мг/л)			

Примечание. MS — среда Мурасиге-Скуга, WPM — Woody Plant Medium (см. раздел «Методика»), 6-БАП — 6-бензиламинопурин, НУК — α -нафтилуксусная кислота, ГК₃ — гибберелловая кислота.

2. Влияние фитогормонов на рост и укоренение микрорастений чая *Camelia sinensis* (L.) в культуре *in vitro*

Среда (фитогормон)	Формирование микрорастений		Частота %	
	число, шт.	высота, мм	контаминации	ризогенеза
MS (ИМК 1,0 мг/л)	60	10,0±0,5	3,3	0
$1/2$ MS (ИМК 1,0 мг/л, ИУК 0,5 мг/л)	60	60,0±0,9	6,7	0
$1/2$ MS (ИМК 1,0 мг/л, НУК 2,0 мг/л)	60	20,5±0,8	3,3	81,0

Примечание. MS и $1/2$ MS — среда Мурасиге-Скуга соответственно с полным и половинным набором минеральных солей, ИМК, ИУК и НУК — соответственно индолил-3-масляная, индолил-3-уксусная и α -нафтилуксусная кислота.

Коэффициент размножения с 3-го пассажа возрастал. В среднем он составил 1:4.

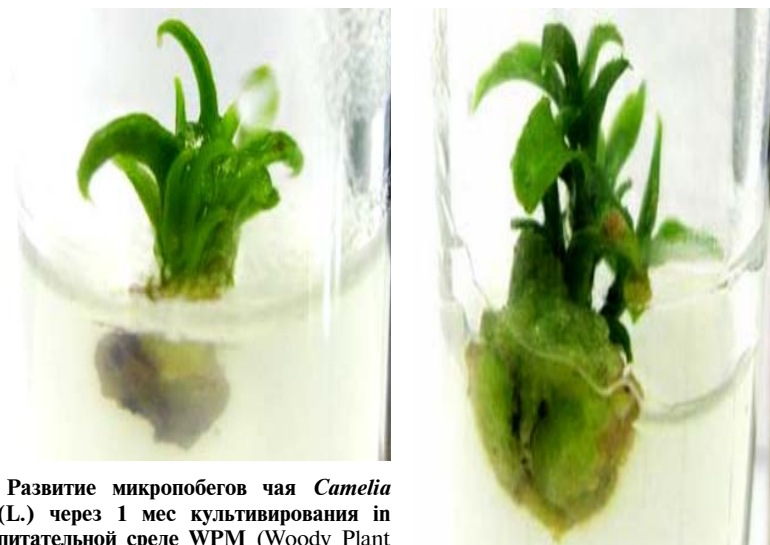


Рис. 1. Развитие микропобегов чая *Camelia sinensis* (L.) через 1 мес культивирования *in vitro* на питательной среде WPM (Woody Plant Medium) с 6-бензиламинопурином (6-БАП, 3,0 мг/л) и аденином (0,9 мг/л) (слева — сорт Колхида, справа — местная популяция).

Оптимальной для укоренения размноженных микрорастений чая (независимо от сортовых особенностей) была питательная среда $1/2MS$ (с половинным набором минеральных солей), дополненная фиторегуляторами индолил-3-масляной кислотой (ИМК, 1,0 мг/л) и α -нафтилуксусной кислотой (НУК, 2,0 мг/л) (табл. 2, рис. 2).



Рис. 2. Ризогенез у микрорастений чая *Camelia sinensis* (L.) *in vitro* на полной питательной среде Мурасиге-Скуга (MS) с добавлением индолил-3-масляной (1,0 мг/л) и α -нафтилуксусной кислоты (2,0 мг/л) (слева — сорт Колхида, справа — местная популяция).

На этой питательной среде через 2,5 мес растения-регенеранты достигли в среднем высоты $20,5 \pm 0,8$ мм, при этом было получено до 81,0 % укорененных микрорастений чая. Наличие в питательной среде повышенной концентрации ауксинов (ИМК 1,0 мг/л и НУК 2,0 мг/л) способствовало развитию мощной корневой системы. От базального каллуса отрастали 2-3 основных корня длиной 2,5-3,0 см, от которых отходили боковые проводящие корни длиной 1,5-2,0 см с множеством корневых волосков. Весь процесс микроразмножения (от высадки первичного экспланта на питательную среду до укоренения микрорастений) занимал 6 мес.

Известно, что культивирование *in vitro* вегетативных органов древесных плодовых культур сопряжено с рядом проблем, таких как сложность получения стерильной культуры, низкие коэффициенты размноже-

ния и укоренения, низкая жизнеспособность микропобегов (33-36). Повышение эффективности размножения и надежности сохранения *in vitro* сортов коллекции цитрусовых возможно за счет оптимизации состава питательных сред и использования техники микропрививки. Исследования по оптимизации протоколов микроразмножения и сохранения генетических ресурсов цитрусовых культур выполняются в институте с 2009 года.

При анатомическом контроле приживаемости тканей у микропривитых растений исследования показали, что через 10-20 сут между микропривоем и подвоем образовывалась общая сосудистая система и меристемы трогались в рост (рис. 3). У таких сортов, как Ударник, Бесколючий, Новофонский, Мейер, приживаемость меристем составила соответственно 65,8; 73,3; 75,2 и 81,6 %. По результатам дисперсионного анализа, доля влияния сорта на приживаемость полученных от него меристем составила лишь 4,8 %, в то время как на влияние источника привоя приходилось 92,4 %; представленные данные достоверны ($F_{\text{факт.}} > F_{05}$).

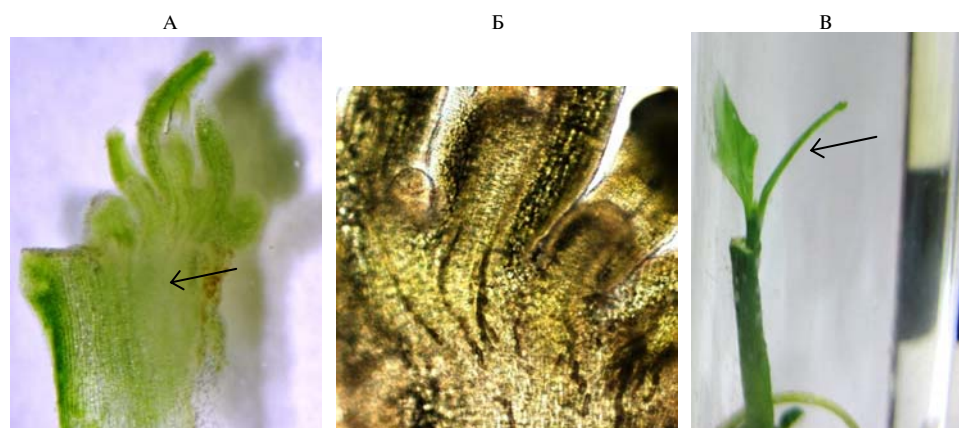


Рис. 3. Приживаемость микропривоя (отмечены стрелками) при микропрививке лимона *Citrus limon* (L.) Вurtt сорта Новофонский на лимон Мейера (*Citrus × meyeri* Meyer) *in vitro*: А, Б — образование общей проводящей системы (через 10 сут), В — начало роста (через 20 сут). Увеличение $\times 400$ (Б).

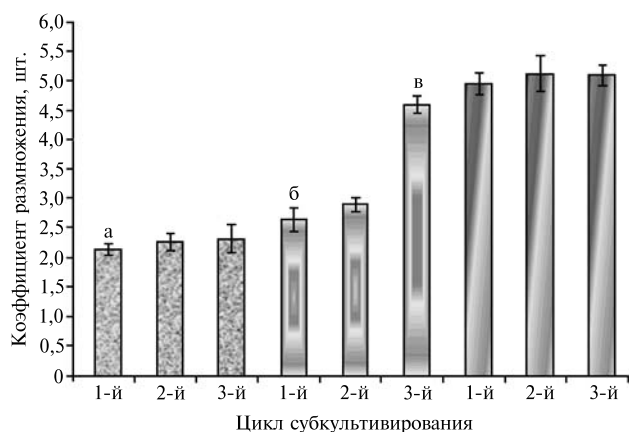


Рис. 4. Коэффициент размножения микропобегов лимона *Citrus limon* (L.) Вurtt *in vitro* в зависимости от их источника и цикла субкультивирования: а — побеги из почек, б — микропривитые побеги, в — сеянцы.

В целом микропобеги привоя характеризовались более быстрым ростом, чем побеги, полученные из почек взрослых растений. После 3-го цикла микропрививки коэффициент размножения микрочеренков в 2 раза превышал аналогичный показатель для микропобегов из пазушных почек растений-доноров и составил 4,6 шт/побег (рис. 4). При этом коэффициент размножения микропобегов из почек взрослых растений после 3-го пассажа существенно не повышался. Таким образом, при перепрививках активируются ростовые процессы благодаря фи-

54

зиологическому омоложению. Следовательно, подобный характер морфогенеза открывает большие возможности для массового размножения и оздоровления генотипов лимона.

При отработке этапов клонального микроразмножения высокодекоративных сортов *C. japonica* одной из наиболее сложных задач (как и для многих других древесных растений) было получение стерильной культуры. Из шести испытанных протоколов лучшие результаты давало последовательное применение K_2MnO_4 (насыщенный раствор), 70 % этанола, 0,2 % новодеза и 5 % пероксида водорода в течение соответственно 30, 1, 20 и 1 мин (37). В этом случае на начальном этапе доля стерильных эксплантов составила 40-42 %, то есть оказалась на 10-15 % выше, чем в других вариантах. Кроме того, при первичном культивировании отмечали положительное действие тетрациклина в концентрации 500-1000 мг/л, добавление которого в питательную среду WPM обеспечивало более высокий (от 29,9 до 45,4 %) выход сохранившихся в культуре *in vitro* стерильных эксплантов (38). Для пазушных и апикальных меристем *C. japonica* оптимальным сроком введения в культуру *in vitro* был конец марта—середина мая, для побегов с пазушными и апикальными почками — конец мая—начало сентября.

При культивировании *C. japonica* на WPM с высокой концентрацией 6-БАП (2,5-3,0 мг/л) в основании микрочеренков и микропобегов формировался компактный светло-зеленый каллус. Помещая его фрагменты на питательную среду с пониженным содержанием 6-БАП (2 мг/л) и ИУК (0,5 мг/л), через 30 сут наблюдали появление морфогенных зон в каллусной ткани. На такой же питательной среде культивировали микропобеги камелии. Их активный рост происходил у 54,5 % эксплантов. Необходимо отметить, что в культуре ткани *C. japonica* адвентивные побеги, как, например, у *C. sinensis*, не развивались. Как следствие, клональное микроразмножение было возможно только за счет увеличения числа междоузлий. У *C. japonica* коэффициент размножения составил 1:3.

При культивировании *in vitro* различных частей чешуй луковицы у эндемика *L. caucasicum* показали, что индукция морфогенеза была неодинакова: через 48 сут в стерильных условиях из базальной и медиальной частей развивались преимущественно адвентивные побеги, реже происходил каллусо- и ризогенез, тогда как в апикальных частях преобладал каллусогенез (табл. 3).

3. Развитие эксплантов *Lilium caucasicum* Miscz. ex Grossh. из разных частей чешуй луковицы на полной среде MS с добавлением НУК (1 мг/л) и 6-БАП (3 мг/л) через 48 сут после введения в культуру *in vitro*

Использованная часть чешуи	Число эксплантов, шт. ($\bar{X} \pm x$)				
	всего	с ризогенезом	с индукцией адвентивных почек	с каллусогенезом	без развития
Базальная	45	13,0±1,07	20,0±0,53	12,0±0,92	0
Медиальная	45	13,0±1,92	15,0±1,60	9,0±0,92	8,0±1,07
Апикальная	45	2,0±0,53	3,0±0,92	7,0±1,07	33,0±0,92

Примечание. MS — среда Мурасиге-Скуга, НУК — α -нафтилуксусная кислота, 6-БАП — 6-бензиламинопурин.

Медиальные части чешуй формировали корни с той же частотой, что и базальные, тогда как развитие по интересующему нас типу (с образованием адвентивных почек и каллусов) отмечалось значительно реже (рис. 5). Реакция апикальных частей на индукцию была менее выраженной, причем изменения эксплантов происходили в их базальной части и проявлялись преимущественно дедифференцировкой клеток и развитием

калусной ткани. Впоследствии при переносе каллусов на среду MS с ауксином 2,4-Д (2 мг/л) наблюдали формирование морфогенных зон и развитие микролуковичек в очагах интенсивного органогенеза (см. рис. 5).

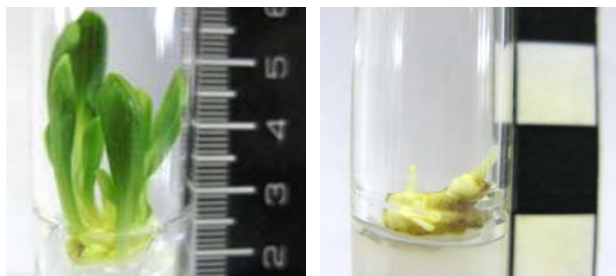


Рис. 5. Адвентивные побеги (слева) и каллусогенез (справа) у эксплантов эндемика *Lilium caucasicum* Misch. ex Grossh., полученных из медиальной части чешуй луковичи, на полной среде Мурасиге-Скуга с добавлением α -нафтилуксусной кислоты (1 мг/л) и 6-бензиламинопурина (3 мг/л).

Итак, для клонального микроразмножения *Camelia sinensis* (L.) Kuntze в качестве эксплантов лучше использовать апикальные и латеральные меристемы размером 0,3–0,5 см, отобранные с мая по октябрь. Пассирование эксплантов на среде WPM (Woody Plant Media) с цитокининами 6-бензиламинопурином (6-БАП, 3,0 мг/л) и аденином (0,9 мг/л) способствовало индукции многочисленных адвентивных микропобегов. При этом коэффициент размножения составил 1:4. Активный рост микропобегов у *C. japonica* L. также отмечали на питательной среде WPM с фиторегуляторами — 6-БАП (2 мг/л) и индоллил-3-уксусной кислотой (ИУК, 0,5 мг/л) при коэффициенте размножения 1:3. У сортов *Citrus limon* (L.) Burm in vitro целесообразно использовать микропрививку, обеспечивающую надежное сохранение генотипов и увеличение коэффициента размножения в 2 раза. У лилии кавказской *Lilium caucasicum* Misch. ex Grossh. (эндемик) индукция адвентивных почек активно происходила из базальной части чешуй луковичи и составила 44,5 %. Проведенное изучение факторов, влияющих на органогенез в культуре in vitro у субтропических и декоративных растений, пополняет знания о морфогенезе в целом и позволяет разработать биотехнологическую методологию получения, сохранения и размножения ценных генотипов.

ГНУ Всероссийский НИИ цветоводства
и субтропических культур Россельхозакадемии,
354002 Россия, г. Сочи, ул. Яна Фабрициуса, 2/28,
e-mail: gvasaliya_aa@mail.ru

Поступила в редакцию
24 марта 2014 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2014, № 3, pp. 49-58

PROPAGATION in vitro OF SUBTROPICAL, ORNAMENTAL CROPS AND ENDEMIC SPECIES OF WESTERN CAUCASUS: DEVELOPED AND IMPROVED PROTOCOLS

T.M. Kolomiets, V.I. Malyarovskaya, M.V. Gvasaliya, L.S. Samarina, R.N. Sokolov

All-Russian Research Institute of Floriculture and Subtropical Crops, Russian Academy of Agricultural Sciences, 2/28, ul. Yana Fabriciusa, Sochi, 354002 Russia, e-mail gvasaliya_aa@mail.ru
Received March 24, 2014

doi: 10.15389/agrobiol.2014.3.49eng

Abstract

To obtain good planting material in floriculture and horticulture, the effective procedures are required for testing and sanitation. Micropropagation is also commonly known as an approach to intensifying plant breeding due to accelerated reproduction of valuable forms and as a way to save biodiversity of rare species. Nevertheless, for many flowering plants, and subtropical fruit crops and endemic species especially, the reliable protocols for in vitro cultivation, regeneration and propagation are not yet reported. This paper presents the results of a revised protocol application and the improvement of clonal micropropagation methods for tea *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, lemon *Citrus limon* (L.) Burm, blossoming shrub *Camellia japonica* L., and *Lilium caucasicum* Misch. ex Grossh., an endangered endemic species in the Western Caucasus. Some peculiarities in obtaining sterile culture are revealed, and the types of explants and seasonal terms of their introduction to in

in vitro culture are identified. Nutrient mediums and conditions for clonal micropropagation are optimized. Thus, cultivation of tea explants on WPM supplemented with phytohormones (i.e. 6-BAP at 3.0 mg/l and adenine at 0.9 mg/l) facilitated the induction of numerous adventitious microshoots. Active growth of *C. japonica* microshoots was also observed on the WPM medium with 6-BAP at 2 mg/l and indole-3-acetic acid at 0.5 mg/l. In lemon cultivars, micrografting is approved as a reliable propagation method. It was revealed that after the third cycle of micrografting the multiplication index for microstals was 2 times higher comparing to that for microshoots from auxiliary buds of donor plants, and made up 4.6 pc. per shoot. The results of in vitro cultivation of the various parts of *Lilium caucasicum* bulb scales showed that the induction of morphogenesis was not the same. After 48 days in vitro cultivation under sterile conditions, from the basal and medial scale parts the adventitious shoots were mainly developing, whereas callus- and rhizogenesis occurred rarely, while in the apical scale parts the callus formation dominated. In special publications there are no data on *L. caucasicum* cell and tissue in vitro cultivation. So, the protocol for in vitro cultivation and propagation of this endangered endemic species of the Western Caucasus is reported here for the first time.

Keywords: speed sterilization, clonal micropropagation, microshoots, micrografting, tea *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, lemon *Citrus limon* (L.) Burm, *Camellia japonica* L., *Lilium caucasicum* Misch. ex Grossh.

REFERENCES

1. Vysotskii V.A. *Biotehnologicheskie metody v sisteme proizvodstva ozdorovlennogo posadochnogo materiala i selektsii plodovykh i yagodnykh rastenii. Doktorskaya dissertatsiya* [Biotechnological methods in production of improved planting material, and fruit and berry plant breeding. DSc Thesis]. Moscow, 1997.
2. *Krasnaya kniga Rossiiskoi Federatsii (rasteniya i griby)* [Red Book of the Russian Federation (plants and fungi)]. Moscow, 2008.
3. *Krasnaya kniga Krasnodarskogo kraia. Rasteniya i griby [Red Book of Krasnodarskii krai. Plants and fungi]. Krasnodar, 2007.*
4. *Citrus genetics, breeding and biotechnology* /I.A. Khan (ed.). CAB International, UK, 2008.
5. Perez-Tornero C.I. An efficient protocol for micropropagation of lemon (*Citrus limon*) from mature nodal segments. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2009, 100: 263-271.
6. Gvasaliya M.V. *V sbornike nauchnykh trudov: Subtropicheskoe i dekorativnoe sadovodstvo* [In: Subtropical and landscape gardening. Issue 46]. Sochi, 2012, vypusk 46: 133-137.
7. Iddagoda N., Kataeva N.V., Butenko R.G. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]*, 1990, 5: 98-104.
8. Gvasaliya M.V. *Sadovodstvo i vinogradarstvo*, 2013, 4: 20-22.
9. Gvasaliya M.V. Materialy Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii «Dendrologiya, tsvetovodstvo i sadovo-parkovoe stroitel'stvo» [Proc. Int. Conf. «Dendrology, Floriculture, and Garden and Park Constructing». V. 2]. Yalta, 2012, tom 2: 93.
10. *FAO Citrus Fruit Production*. Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, FAOSTAT, 2009 (<http://faostat.fao.org>).
11. Globa-Mikhailenko I.D. *Subtropicheskie kul'tury*, 1980, 3: 32-35.
12. Butenko R.G., Shengeliya L.N. *V sbornike: Kul'tura kletok rastenii i biotehnologiya [Plant cell culture and biotechnology]*. Moscow, 1986: 110-113.
13. Globa-Mikhailenko I.D., Khusaini S. *Tezisy dokladov Vsesoyuznoi konferentsii molodykh uchenykh i aspirantov* [Proc. Conf. of Young Scientists and Graduate Students of the USSR]. Tbilisi, 1987: 131.
14. Rathore J.S. Micropropagation of mature tree of *Citrus limon*. *Ind. J. Biotechnol.*, 2007, 6: 239-244.
15. Saini H.K. Direct shoot organogenesis and plant regeneration in rough lemon (*Citrus jambiri* Lush.) *Gill. Ind. J. Biotechnol.*, 2010, 9: 419-423.
16. Singh S. Citrus biotechnology: Achievements, limitations and future directions. *Physiol. Mol. Biol. Plants.*, 2009, 15(1): 3-22.
17. Karpun Yu.N. *Subtropicheskaya dekorativnaya dendrologiya* [Subtropical landscape dendrology]. St. Petersburg, 2010.
18. Edison S., Unnikrishnan M., Vimala B., Santha V. *Biodiversity of tropical tuber crops in India*. National Biodiversity Authority, Chennai, Tami Nadu, India, 2006.
19. Reed B., Sarasan M., Kane V. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In vitro Cell Dev. Biol. — Plant*, 2011, 47: 1-4.
20. Barnicoat H., Cripps R., Kendon J., Sarasan V. Conservation in vitro of rare and threatened ferns — case studies of biodiversity hotspot and island species. *In vitro Cell Dev. Biol. — Plant*, 2011, 47: 37-45.
21. Marriott P., Sarasan V. Novel micropropagation and weaning methods for the integrated conservation of a critically endangered tree species, *Medusagyne oppositifolia*. *In vitro Cell Dev. Biol. — Plant*, 2010, 46: 516-523.

22. Sarasan V. Importance of in vitro technology to future conservation programmes worldwide. *Kew Bulletin*, 2010, 65: 549-554.
23. Sarasan V., Kite G., Sileshi C. Applications of phytochemical and in vitro techniques for reducing over-harvesting of medicinal and pesticidal plants and generating income for the rural poor. *Plant Cell Rep.*, 2011, 30: 1163-1172.
24. Coates D.J., Dixon K.W. Current perspectives in plant conservation biology. *Austral. J. Bot.*, 2007, 55(3): 187-193 (<http://dx.doi.org/10.1071/BT07037>).
25. Evsyukova T.V., Kolomiets T.M. V sbornike: *Nauchnye osnovy razvitiya tsvetovodstva Rossii i proektirovanie sadovykh landshaftov* [Scientific bases for floriculture development in Russia and garden landscape design]. Moscow, 2006: 94-97.
26. Tibilov A.A. *Metodicheskie rekomendatsii po klonal'nomu mikrorazmnozheniyu shafrana prekrasnogo v kul'ture in vitro* [In vitro clonal micropropagation of *Crocus speciosus*]. Moscow, 2003.
27. Sokolov R.N., Kolomiets T.M., Malyarovskaya V.I. *Politematicheskii setevoi elektronnyi nauchnyi zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2013, 10(094) (<http://ej.kubagro.ru/2013/10/pdf/13.pdf>).
28. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum*, 1962, 15: 473-497.
29. Gamborg O.G., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley. *Canad. J. Biochem.*, 1968, 46(5): 417-421.
30. Lloyd G., McCown B.H. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture. *Combined Proceedings, Int. Plant Propagators Society USA*, 1980, 30: 421-427.
31. Navarro L. Citrus shoot-tip grafting in vitro and its application: a review. *Proc. Int. Citriculture*, 1981, 1: 452-456.
32. Dospelkov B.A. *Metodika polevogo opyta* [Methods of field trials]. Moscow, 1985.
33. Samarina L.S. Regeneration and micropropagation of lemon cultivars in vitro from nodal explants. *Russian Agricultural Science*, 2010, 36(6): 417-420.
34. Samarina L.S. *Optimizatsiya priemov mikrorazmnozheniya i sokhraneniya limona in vitro. Avtoreferat kandidatskoi dissertatsii* [Optimization of lemon micropropagation and in vitro conservation. PhD Thesis]. Moscow, 2013.
35. Driver J.A., Kuniyuki A.H. In vitro propagation of Paradox walnut rootstock. *Hortscience*, 1984, 19: 507-509.
36. Singh B., Sharma S., Rani G., Hallan V., Zaidi A.A., Virk G.S., Nagpal A. In vitro micrografting for the production of Indian citrus ringspot virus (ICRSV)-free plants of kinnow mandarin (*Citrus nobilis* Lour × *C. deliciosa* Tenora). *Plant Biotechnol. Rep.*, 2008, 2: 137-143 (doi: 10.1007/s11816-008-0055-6).
37. Malyarovskaya V.I. V sbornike nauchnykh trudov: *Subtropicheskoe i dekorativnoe sadovodstvo* [In: Subtropical and landscape gardening. Issue 47]. Sochi, 2012, vypusk 47: 161-168.
38. Malyarovskaya V.I. Materialy Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii «Biologicheski aktivnye veshchestva rastenii — izuchenie i ispol'zovanie» [Proc. Int. Conf. «Bioactive Substances of Plants: Study and Use»]. Minsk, 2013: 140-141.