

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

БИОТЕХНОЛОГИЯ (В ТОМ ЧИСЛЕ БИОНАНОТЕХНОЛОГИИ)

DOI - 10.32743/UniChem.2022.93.3.13186

ОСОБЕННОСТИ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
В УСЛОВИЯХ IN VITRO ОДНОДОЛЬНЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ**Курбаниязова Гулсауир Танирберген кизи**

базовый докторант,
Институт ботаники Академии наук Республики Узбекистан,
Республика Узбекистан, г. Ташкент
E-mail: kurbaniyazova94@list.ru

Мустафина Феруза Усмановна

ст. науч. сотр.,
Институт ботаники Академии наук Республики Узбекистан,
Республика Узбекистан, г. Ташкент

Жамалова Дилафруз Немадилла кизи

базовый докторант,
Институт ботаники Академии наук Республики Узбекистан,
Республика Узбекистан, г. Ташкент

THE NUTRIENT MEDIUM IN MONOCOTYLEDONOUS PLANTS

Gulsauir Tanirbergen kizi Kurbaniyazova

Basic doctorate,
Institute of Botany of the Academies of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
Republic of Uzbekistan, Tashkent

Feruz Mustafina

Senior scientific fellow,
Institute of Botany of the Academies of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
Republic of Uzbekistan, Tashkent

Dilafruz Nematilla kizi Jamalova

Basic doctorate,
Institute of Botany of the Academies of Sciences of the Republic of Uzbekistan,
Republic of Uzbekistan, Tashkent

АННОТАЦИЯ

В настоящем обзоре представлены и обсуждены протоколы микроклонального размножения однодольных видов растений, составы питательных сред и использование регуляторов роста на разных этапах морфогенеза. Обзор позволил выделить основные компоненты, влияющие на успешное культивирование однодольных видов растений в условиях *in vitro*.

ABSTRACT

The protocols of microclonal propagation of monocot plant species, nutrient media content and the use of growth regulators at different stages of morphogenesis are presented and discussed in this review. The review allowed identifying the essential components influencing successful *in vitro* cultivation of monocot plant species.

Ключевые слова: культура *in vitro*, минеральные соли, углеводное питание, витамины, регуляторы роста, эксплант, цитокинины, ауксины.

Keywords: *in vitro* culture, mineral components, carbohydrate nutrition, vitamins, growth regulators, explant, cytokinins, auxins.

В последние десятилетия при решении проблемы сохранения генофонда растений успешно используются методы биотехнологии, включающие микрклональное размножение *in vitro*. Основу биотехнологии растений составляет культура клеток, органов и тканей, клеточная и генетическая инженерия, получение вторичных метаболитов. Использование методов размножения *in vitro* представляет собой важную дополнительную возможность для сохранения многих «проблемных» видов в ботанических садах [5, 23]. Растительные системы *in vitro* являются удобными объектами для исследования процессов клеточной дифференциации, морфогенеза, эмбриогенеза, биологии развития и регенерации растений, а также для получения новых сортов и форм.

Методы культивирования *in vitro* в настоящее время незаменимы для получения растений, свободных от болезней, быстрого размножения редких генотипов растений, трансформации генома растений и получения метаболитов растительного происхождения, имеющих важную коммерческую ценность [2, 3].

Оптимизация питательных сред является первым этапом культивирования растительных объектов. Правильно подготовленная питательная среда - основной фактор успешного культивирования изолированных органов, тканей и клеток растений. Основными компонентами питательных сред являются минеральные соли (макро и микроэлементы), источник углеводного питания (сахароза), витамины и регуляторы роста (фитогормоны). Иногда в состав питательных сред входят органические добавки (гидролизат казеина, кокосовое молоко, дрожжевой экстракт, эндосперм кукурузы).

В 1985 году Кристина Д. Кромер проводила исследования регенеративного потенциала корневищ, луковиц и клубнелуковиц десяти видов однодольных растений, относящихся к четырем семействам: Amaryllidaceae J.St.-Hil. (*Haemanthus katharinae* Baker, *Crinum abyssanicum* Hochst. ex A. Rich., *Leucojum vernum* L.), Araceae Juss. (*Spathiphyllum wallisii* Regel), Iridaceae Juss. (*Crocus vernus* (L.) Hill, *Iris germanica* L.), Liliaceae Juss. (*Hosta lancifolia* (Thunb) Engl.), Asparagaceae Juss. (*Scilla laxiflora* Baker, *Veltheimia viridifolia* Jacq., *Muscari racemosum* Mill.) [16].

Исследования вегетативного роста однодольных растений *in vitro* проводились путем культивирования меристем [11, 17, 27], индукции боковых побегов [6, 12, 24] и эмбрионов в культуре каллусов [31], а также индукции регенерации непосредственно на изолированных тканях [16, 26].

2005 году Л.М. Такамори, Н. Барбоса, М.Б. Макадо Нето, Л.Г. Эстевес Виеире и А.В. Рибас провели исследования для определения различных концентраций регуляторов роста на индукцию каллуса, соматический эмбриогенез и регенерацию растений *Urochloa* [31].

Результаты экспериментов показывают, что ауксины при взаимодействии с кинетином давали самый высокий процент регенерирующих эксплантов, а также большое количество адвентивных почек на последних. Стимуляция мозолевой ткани была

наибольшей под воздействием 2,4-дихлорфенилуксусной кислоты (2,4-D) и слабее при использовании индолилуксусной кислоты (ИУК).

Продемонстрировано, что инициация организованного роста приводит к изменениям в метаболизме [34] и заставляет фитогормоны играть важную роль в этом процессе [36]. Дифференцировка органов в культуре тканей происходит благодаря взаимодействию ауксинов и цитокининов, и здесь существенное значение имеет количественное соотношение этих двух групп регуляторов роста [32]. Знание гормональной регуляции процессов регенерации позволит внедрить в садоводческую практику методику культивирования тканей *in vitro* исследуемых видов.

Образование каллуса с рыхлой структурой в месте среза базальной пластинки было отмечено на эксплантах *Crinum* и *Haemanthus*. Интенсивность роста каллуса зависела от ауксинов, содержащихся в среде, особенно никотинуксусной кислоты (НУК) и 2,4-D, которые стимулировали его развитие. Экспланты *H. katharinae* образовывали каллус более обильно, чем экспланты *C. abyssanicum*. На среде Мурасиге и Скуга [21] (МС) и ее комбинации с эксплантами *Leucojum vernum* L. не образовывали каллусную ткань при наличии регуляторов роста.

На контрольной среде МС отмечена плохая (4-30%) регенерационная способность эксплантов изучаемых видов. Кинетин, добавляемый в среду, обычно не увеличивал количество регенерирующих эксплантов. Действие кинетина проявлялось в образовании большего количества луковиц на экспланте. Отсутствие регуляторов роста или добавление в среду исключительно кинетина привело к гибели примерно половины эксплантов *H. katharinae*. Наиболее успешная регенерация *C. abyssanicum*, достигающая 38%, была получена на среде, содержащей ауксин НУК или ИУК с кинетином. Применение 2,4-D вызывал полное ингибирование органогенеза этого вида. Добавление кинетина в среду, содержащую 2,4-D, не отменяло ингибирующего действия этого ауксина. В отличие от *C. abyssanicum*, среда с 2,4-D и кинетином инициировала регенерацию наибольшего числа эксплантов *H. katharinae* (66%). Более раннее начало адвентивных луковиц *H. katharinae* и лучшее развитие листьев и корней наблюдались на среде с более высокими концентрациями НУК (2 мг/л) и 2,4-D, добавленными вместе с кинетином. Эффективность всех примененных ауксинов и их комбинаций с кинетином для *L. vernum* была значительной (70-90%).

Исследуемые виды семейств Asparagaceae (*S. laxiflora*, *M. racemosum*, *H. lancifolia*, *V. viridifolia*) легко регенерировали почки и корни в данных условиях культуры *in vitro*, даже на средах без регуляторов роста. Особенно высокой регенеративной способностью на контрольной среде обладали экспланты *M. racemosum* (81%). В зависимости от вида и среднего варианта количество эксплантов, регенерирующих почки, достигало 63-100%. На одном экспланте отмечали от 1 до 20 адвентивных почек. Об аналогичной готовности к пролиферации луковиц на фрагментах чешуи *Lilium speciosum* Thunb. сообщали Робб [30], Хаскетт [10], на *Lilium longiflorum* Thunb.

Аллен [1], на чешуе *Hyacinthus orientalis* L. Пьерик и Рюйбинг [25], Саньевс и др. и Пьерик и Стегманс [27]. Это позволяет сделать вывод, что чешуи лукович семейства лилейных обладают высоким регенерационным потенциалом. Като и Кавахара [14] при использовании сред без регуляторов роста получили инициацию почек на изолированных фрагментах *Heloniopsis orientalis* (Thunb.) Tanaka, высокую тотипотентность клеток *Ornithogalum thyrsoides* Jacq. отметил также Hussey [13]. Эти результаты свидетельствуют о том, что частое повреждение тканей у растений этого семейства приводит к инициации клеточного деления, что является проявлением высокого регенеративного потенциала представителей этого семейства.

Отмечена плохая (4-30%) регенерационная способность эксплантов исследуемых видов на контрольной среде МС. Добавление кинетина в среду обычно не увеличивало количество регенерирующих эксплантов. Действие кинетина проявлялось в образовании большего количества лукович на эксплантате. Отсутствие регуляторов роста или добавление в среду только кинетина вызывало гибель примерно половины эксплантов *H. katharinae*.

Эффективность всех применяемых ауксинов и их комбинаций с кинетином на *L. vernum* была значительной (70-90%). Рост каллуса у всех исследованных видов этого семейства начинался с места ранения, а на среде с 2,4-Д постепенно покрывал всю поверхность эксплантата. Два оставшихся ауксина - НУК и ИУК, были менее эффективны в индукции его роста. Зеленый каллус с компактной структурой, сформированный на эксплантах *H. lancifolia*, и кремовая ткань каллуса *M. racemosum* имели рыхлую структуру. Экспланты *S. laxiflora* формировали зернистый зеленый каллус, а у *V. viridifolia* он был кремового цвета. Способность к дифференцировке почек и корней в каллусной ткани *H. lancifolia* наблюдалась спорадически на средах с НУК и ИУК и их комбинациях с кинетином через четыре месяца культивирования. На поверхности каллуса появилось несколько бугорков. В пассированной каллусной ткани *M. racemosum* также наблюдали закладку адвентивных лукович и зубцов.

На контрольной среде МС отмечена регенеративная способность эксплантов всех видов, причем наибольшая у чешуй лукович *M. racemosum* (81%). Добавление кинетина в среду увеличивало количество образовавшихся бутонов и лукович у всех видов. На закладку почек и корней *H. lancifolia* положительно влияли 2,4-Д и ИУК, однако наибольший процент (81%) регенерирующих эксплантов был получен на среде, содержащей 1 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л кинетин (1:1). Применяемые ауксины и их комбинации с кинетином, за исключением среды, содержащей 2,4-Д и кинетин, индуцировали образование лукович на всех эксплантатах *M. racemosum* и увеличивали их среднее количество на экспланте. Добавление в среду НУК и ИУК заметно повышало способность закладки лукович у *S. laxiflora* и *V. viridifolia*, но наилучшие эффекты регенерации пророски (75%) у *V. viridifolia* (63%)

отмечены на средах с НУК и кинетином. 2,4-Д, присутствующий в средах, тормозил регенеративную реакцию *M. racemosum*, полностью ингибировал регенерацию лукович и корней у *S. laxiflora* и *V. viridifolia*, тогда как у видов *H. lancifolia* при использовании с кинетином стимулировал регенерацию наибольшего количества эксплантов.

Фрагменты корневищ видов *S. wallisii*, принадлежащих к семейству Agaceae, также показали высокую регенерационную способность, обусловленную применением подходящего варианта среды. Кинетин, добавленный в среду в присутствии 2 мг/л НУК, индуцировал несколько иной ход регенерации. Наилучшие результаты были получены при добавлении в среду НУК в концентрации 1 мг/л. Вторым по эффекту был ауксин 2,4-Д, который стимулировал образование наибольшего количества почек на экспланте, тогда как наибольшее количество (88%) укорененных растений было получено на среде с 1 мг/л НУК вместе с кинетином.

Медленное течение регенерации *Caladium hortulanum* на фрагментах лукович наблюдали Кукульчанка и Прадота [16], а на черешках листьев этого же растения Климашевская [15].

Пьерик [25] сообщил о зарождении каллусной ткани на фрагментах листьев *Anthurium andraeanum* Linden ex Andre через 3-4 месяца культивирования. Однако медленно протекающая дедифференцировка клеток не повлияла на эффективность процессов морфогенеза, наблюдаемых у представителей этого семейства.

Экспланты *S. wallisii* образовывали на поверхности раны от 7 до 20 адвентивных растений. Исследования Кукульчанки и Прадоты [15] на каладиуме указывают на чрезвычайно высокий регенеративный потенциал этого вида. Столь же высокая закладка почек и корней в каллусе, полученном из листьев *A. andraeanum*, наблюдалась и в каллусе *A. scherzerianum* Пьериком и Стигмансом [27].

Виды, принадлежащие к семейству Amaryllidaceae, показали более низкую регенерационную способность, чем представители семейства Liliaceae. Инициация бутонов видов Liliaceae наблюдалась даже на среде без добавления регуляторов роста, однако меньший процент эксплантов проявлял морфогенетическую реакцию как на контрольных средах, так и под влиянием добавленных ростовых веществ. Один эксплант обычно формировал одну или две почки. Было обнаружено, что фрагменты лукович *L. vernum* регенерируют луковичи в более высоком проценте, чем два оставшихся тестируемых вида: *H. katharinae* и *C. abyssinicum*.

Регенерация лукович и их развитие на эксплантатах происходило медленно (между 8-й и 12-й неделями культивирования). Подобная медленная регенерация наблюдалась Хуссей [11] и у других растений семейства амариллисовых.

Наихудшая регенерация в данных условиях культивирования наблюдалась у двух видов семейства Iridaceae: *I. germanica* и *C. vernus*. Регенерация на основной среде у растений этого семейства происходила спорадически.

В проведенных исследованиях лишь небольшое количество эксплантов клубнелуковиц *C. vernus* и корневищ *I. germanica* регенерировало почки и корни на нескольких вариантах среды, а на одном экспланте всегда формировалась только одна почка. Зив и др. [38] наблюдали регенерацию бутонов и клубнелуковиц *Gladiolus hortulanus* L.H. Bailey, инициированную исключительно каллусом молодых цветочных стеблей. Каллус, полученный из луковиц этого растения, был неспособен к закладке органов и погибал через несколько недель пересева.

Используя метод иммуно-ферментного анализа (ИФА), а также методологический подход, предложенный В.Ю. Горбуновой и др. [10], на пшенице показана возможность индукции формирования пыльниковых каллусов и регуляции путей морфогенеза *in vitro* в них путем выявления для каждого сорта адекватного баланса между содержанием эндогенной ИУК в пыльниках донорных растений при инокуляции на питательную среду и концентрацией экзогенного ауксина в составе питательной среды.

Так, методом ИФА было выявлено, что ряд изученных сортов пшеницы, отнесенных к группе высокоауксиновых, содержали в пыльниках сравнительно высокое количество эндогенного ауксина ИУК: сорт Скала – 324,8±38,1; сорт Башкирская 26 – 276,9±3,7; сорт Омская 35 – 429,5±6,3 нг/г сухого веса. Индукция формирования каллусов наблюдалась у этих сортов при использовании питательной среды, содержащей синтетический ауксин 2,4-Д в сравнительно низких концентрациях – 1,0 мг/л у сорта Омская 35 и 1,0–1,5 мг/л у сортов Скала и Башкирская 26.

Выявлено, что эмбриогенез в каллусах высокоауксиновых сортов пшеницы индуцируется при концентрации экзогенной ИУК 0,1 мг/л, а в каллусах низкоауксиновых сортов – 0,5 мг/л. К гемморизогенезу в каллусах высокоауксиновых сортов приводило использование концентрации экзогенной ИУК 0,5 мг/л, а в каллусах низкоауксиновых сортов – 1,5 мг/л [31].

Анализ приведенных экспериментальных данных свидетельствуют о том, что баланс между содержанием эндогенного ауксина ИУК в экспланте и концентрацией экзогенного ауксина 2,4-Д в питательной среде для индукции формирования каллуса и ИУК для индукции путей морфогенеза *in vitro* в каллусах

состоит в обратной зависимости между этими показателями.

В настоящее время в Институте ботаники Республики Узбекистан ведутся работы по размножению *in vitro* лекарственных растений, эндемичных и краснокнижных видов рода *Ungernia* Bunge.

Род *Ungernia* входит в семейство Amaryllidaceae, является однодольным растением. Это лекарственное растение высоко оценено как врачами древнего Тибета, так и современной медициной. Фармакологическая ценность вида обусловлена синтезом изохинолиновых алкалоидов, основные из которых – галантамин и ликорин [45].

В ходе экспедиций 2020–2021 гг. собран живой материал *U. victoris*, *U. sewertzowii* (корневища и луковички) в районах естественного ареала на Памире (Гиссарский хребет) и Западном Тянь-Шане (Чимганский хребет, Пскемский хребет).

Источниками эксплантов видов рода *Ungernia* (луковицы) для введения в культуру *in vitro* послужили растения, привезенные в 2021 году из экспедиций сотрудниками лаборатории молекулярной филогении и биогеографии Института ботаники АН РУз. Часть луковиц была использована в качестве эксплантов, часть высажена на экспериментальном участке Ботанического сада имени Ф.Н. Русанова (рис. 1).

Для видов рода *Ungernia* использовали агаризованные и жидкие среды с общей минеральной основой по прописи Мурасиге и Скуга [21], но с различным содержанием сахарозы, фитогормонов и микродобавок. Компоненты, по которым отличались использованные варианты питательных сред, приведены в (табл. 1).

Для видов рода *Ungernia* наиболее оптимальными отмечены питательные среды, в которых использовались комбинации α -НУК в концентрациях 2 и 0,5 мг/л, а также кинетина в концентрациях 1 и 0,02 мг/л, соответственно. В большинстве публикаций отмечается использование среды по прописи Воллосовича [40] и Мурасиге и Скуга [21]. При этом в качестве экспланта в большинстве работ использованы чешуи луковиц, которые предварительно были подвержены холодной стратификации.

Таблица 1.

Состав различных питательных сред, использованных при микроклонировании *U. Victoris*

№	Среда					Органические добавки		
		2,4-Д	НУК	ИУК	Кинетин	Мезоинозит	Гидролизат казеина	Сахароза
Среда Мурасиге-Скуга (1962)								
1	МС	-	-	2	0,2	100	-	30 000
2	МС-1	1	-	-	0,1	100	1000	30 000
3	МСТ	-	2	-	1	80	500	30 000
Среда Эриксона (1965)								
4	Ер	-	2	-	1	-	-	40 000
Среда Гамборга и Эвелеге (1968)								
5	В5	2	-	-	-	100	-	20 000

№	Среда					Органические добавки		
		2,4-Д	НУК	ИУК	Кинетин	Мезоинозит	Гидролизат казеина	Сахароза
Среда Воллосовича (1979)								
6	5C	-	-	-	-	-	-	50 000
7	5C0	0,5	-	1	0,1	100	500	50 000
8	5C01	-	2	-	1	80	500	50 000
9	5C02	-	0,5	-	0,1	50	200	50 000
10	5C03	-	0,1	-	0,02	20	50	50 000
11	5C1	1	-	-	0,1	80	500	50 000
12	5C2	0,5	-	-	0,1	50	200	50 000
13	5C3	0,1	-	-	0,02	20	50	50 000
14	5C3H	-	0,5	-	0,02	20	50	50 000
15	5C3I	-	-	2	0,02	20	50	50 000

В работе Кунак и др. [42] были исследованы 4 минеральные среды: среда Мурасиге-Скуга [20], Эриксона [4], Гамборга и Эвелеге [7], Воллосовича и др. [40] (табл. 1). Экспланты были получены из чешуй луковиц размером 0,5x0,5 (1) см. Всего было рассмотрено 50 вариантов питательных сред. Режим освещения составлял 1 500-2 000 люкс с фотопериодом 16/8 часов при 24-26°C в пробирках диаметром 2 см и объемом 10 мл.

Среди исследованных питательных сред на среде Гамборга и Эвелеге [7] не наблюдалась регенерация каллусной ткани. На среде Мурасиге-Скуга [21] показатели были низкие в сравнении со средой Воллосовича [40]. При этом наиболее хорошие результаты наблюдались при концентрации НУК - 0,5-2 мг/л или ИУК 1-2 мг/л и цитокинина кинетина 0,02-1 мг/л. Наилучшие результаты были получены на средах 5C3I и 5C3H с концентрацией ауксина ИУК 2 мг/л или НУК 0,5 мг/л, а также кинетина 0,02 мг/л.



А



Б

**Рисунок 1. *Ungernia victoris* A. Карта распространения (Красная книга РУз, 2019).
 Б. Цветущие растения. Узбекистан, г. Ташкент, Ботанический сад им. Ф.Н. Русанова, 26.06.2010
 (Фото А.Дж. Газиев)**

Заключение

Культуры тканей *in vitro* однодольных видов растений, регенерация которых достигает 80—100%, должны найти применение в садоводческой практике, так как они обладают чрезвычайно высоким регенерационным потенциалом. Для большинства однодольных наилучшим эксплантом оказались чешуйки луковиц. Для многих однодольных видов показано лучшее влияние 2,4-Д в сравнении с ИУК, хотя имеются данные о микроразмножении однодольных видов с использованием только ИУК или НУК, а применение 2,4-Д вызывало полное ингибирование

органогенеза. Эффект большинства ауксинов при микроразмножении однодольных усиливался при добавлении кинетина. На наш взгляд, определяющую роль в балансе экзогенных ауксинов и цитокининов играет генотип донорного растения, детерминирующий признак «уровень эндогенных гормонов в экспланте».

При проведении эмбрионов в культуре каллусов, а также индукции регенерации непосредственно на изолированных тканях односемянных растений *in vitro* семейство Liliaceae давало более высокую потенциал, чем семейства Iridaceae и Amaryllidaceae.

Список литературы:

1. Allen T.C. Production of virus free lilies. *Acta Hort.* 1974.–№36. – P.235-239.
2. Altpeter F, Springer NM, Bartley LE, Blechl AE, Brutnell TP, Citovsky V, Conrad L, Gelvin SB, Jackson D, Kausch AP, Lemaux PG, Medford JI, Orozco-Cardenas M, Tricoli D, VanEck J, Voytas DF, Walbot V, Wang K, Zhang ZJ, Stewart CN. Advancing crop transformation in the era of genome editing// *Plant Cell.* 2016.–№28. – P.1510–1520. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00196>
3. Claudia A. Espinosa-Leal · César A. Puente-Garza · Silverio García-Lara. In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds// *Planta.* 2018. –№248 – P.1–18. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>
4. Eriksson T. Studies on the growth requirements and growth measurements of cell cultures of *Haplopappus gracilis*. *Ibid.* 1965. V. 18. –P. 976–993.
5. Fay M. Conservation of rare and endangered plants using in vitro methods. *In vitro Cellular and Developmental Biology.* 1992. V. 28. –P. 1–4.
6. Fridborg G. Growth and organogenesis in tissue cultures of *Allium cepa* var. *proliferum*. *Physiol. Plant.* 1971. –№ 25 – P. 436-440.
7. Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley. *Canadian Journal of Biochemistry.* 1968. V. 46 (5). –P. 417-421.
8. Gautheret R.J. Sur la possibilite de realiser la culture indefinie des tissus de tubercule de carotte. *Compt. Rend. l'Acad. Sci., Paris.* 1939. –№ 208. – P. 218.
9. Gorbunova V.Yu., Kruglova N.N., Abramov S.N. The induction of androgenesis in vitro in spring soft wheat. Balance of exogenous and endogenous phytohormones // *Biol. Bull.* 2001. V. 28. –P.25–30. DOI:10.1023/A:1026602603527
10. Hackett W.P. Aseptic multiplication of lily bulblets from bulb scales. *Proc. Intern. Plant. Prop. Soc. Ann. Meeting.* 2005.– №19. –P.105-108. DOI:10.17660/ACTAHORTIC.2005.673.43
11. Hammer P.A., Tissue culture propagation of *Hosta decorata* Bailey. *Hort. Science.* 1976. –№11(2). –P. 309.
12. Havranek P., Novak F.J. The bud formation in the callus cultures of *Allium sativum*. *L.Z. Pflanzenphysiol.* 1973. – № 68. – P. 303-318.
13. Hussey G. Totipotency in tissue explants and callus of some members of the Liliaceae, Iridaceae and Amaryllidaceae. *J. Exp. Bot.* 1975. –№ 26. – P. 253-262.
14. Kato Y., Kawahara S. Bud formation in leaves, leaf fragments and midrib pieces of *Helionopsis orientalis* (Liliaceae). *Planta.* 1974. –№107. –P. 111-120.
15. Klimaszewska K. Plant regeneration from petiole segments of some species in tissue culture. *Acta Agrobot.* 1981. – № 34. –P. 5-28.
16. Kromer K.D. Regeneration of some monocotyledonous plants from subterranean organs in vitro // *Acta Agrobotanica.* 1985. Vol.38. – P. 65-87.
17. Kukulczanka K., Prodota B. Restitutive regeneration in *Caladium x hortulanum* Birdsey tissue culture. *Proceedings of the Internat. Hort. Congress Warszawa, September.* 1974. Vol IB. –P. 842
18. Kukulczanka K., Sarosiek J. Merysystematyczne kultury storczykow, *Wiad. Bot.* 1971. XV. 1. –P.29-41.
19. Morel G. and Wetmore R.H. Tissue culture of monocotyledons. *American Journal of Botany*, Vol. 38, No. 2. Feb. 1951. –P. 138-140 Published by: Botanical Society of America Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/2437836>
20. Morel G.M. The orchids. Clonal multiplication of orchids. Ed.C. Withner N. York, London, Sydney, Toronto. *Plant Cell and Tissue Culture.* 1974. – P. 181-191 DOI: 10.1385/0-89603-161-6:181
21. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 1962. –№ 15. –P. 473:497.
22. Menendez Yuffa A., Da Silva R., Rios L., de Enrech N. Mitotic aberrations in coffee (*Coffea arabica* cv. 'Catimor') leaf explants and their derived embryogenic calli // *Electronic J. Biotechnol.* – 2000. –Vol.3, No 2. –P. 1-6.
23. Nobecourt P. Sur la perennite et l'augmentation de volume des cultures de tissus vegetaux. *Compt. Rend. Soc. Biol. (Paris)* 1939. –№130. – P. 1270.
24. Pence V.C. The application of biotechnology for the conservation of endangered plants // *Plant Conservation Biotechnology* / Ed. E.E. Benson. Chapter 15. London: Taylor and Francis. 1999. –P. 227–241.
25. Pierik R.L.M. *Anthurium andraeanum* plantlets produced from callus tissues cultivated in vitro. *Physiol. Plant.* 1976. – № 37. – P. 80-82.
26. Pierik R.L.M., Ippel B.J. Plantlet formation from excised bulb scale segments of *Nerine*. *Acta Hort.* 1977. – №78. – P. 197-202.
27. Pierik R.L.M., Steegmans H.H. M. Vegetative propagation of *Freesia* through the isolation of shoots in vitro. *Neth. J. Agric. Sci.* 1976. –№ 24. –P. 274-277.

28. Radi S., Proli M., Pavlica M, Pevalek Kozlina B. Cytogenetic stability of *Centaurea ragusina* longterm culture // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 2005. –№ 3. – P. 343–348.
29. Reuther G., 1977. Embryoide Differenzierungsmuster in Kallus der Gattungen *Iris* und *Asparagus*. Ber. Deutsch. Bot. Ges. Bd. –№90. –P.417-437.
30. Robb S.N. The culture of excised tissue from bulb scales of *Lilium speciosum* Thunb. J. Exp. Bot. 1957. –№ 8. – P. 348-352
31. Seldimirova O.A., Kruglova N.N. Properties of the initial stages of embryoidogenesis in vitro in wheat calli of various origin // Biol. Bull. 2013. V. 40. –P. 447–454. DOI: 10.1134/S1062359013050154
32. Skoog -F., Miller C.O., Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultivated in vitro. [Ini] Biological Action of Growth Substances. Symp. Soc. Exp. Biol. 1957. –№ 11. – P. 118-131.
33. Takamori L.M., Machado Neto N.B., Esteves Vieira L.G., Ribas A.F. Optimization of somatic embryogenesis and in vitro plant regeneration of *Urochloa* species using picloram// In Vitro Cell.Dev.Biol.Plant. 2015. –№51 – P. 554–563. DOI 10.1007/s11627-015-9701-1
34. Thorpe T.A. Physiological and biochemical aspect of organogenesis in vitro. Proceedings of the 4th International Congress of plant Tissue and cell culture, Calgary, 1978. №5. –P.49-59
35. Van Overbeek, J., Marie E. Conklin, and A.F. Blakes- lee. Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. Science. 1941. –№94. –P.350-351.
36. Vardjan M., Nitsch J.P. Le regeneration chez *Cichorium endiva* L.: etude auxins et des “kinines” endogenes. Bull.Soc.Bot.Fr. 2014. –№ 108. – P. 363-374.
37. White P.R., Potentially unlimited growth of excised plant callus in artificial nutrient. Amer. Jour. Bot. 1939. –№ 26. – P. 54-64.
38. Ziv M., Halevy A.H., Shilo R. Organs and plantlets regeneration of *Gladiolus* through tissue culture. Ann. Bot. 1970. – №34. –P. 671-676.
39. Агапова Н.Д., Архарова К.Б., Вахтина Л.И., Земскова Е.А., Тарвис Л.В. Числа хромосом цветковых растений флоры СССР: семейства *Aceraceae*–*Menyanthaceae*. – Ленинград: Наука, 1990. – С. 48.
40. Воллосович А.Г., Пучинина Г.М., Николаева Л.А. Оптимизация состава макросолей для культуры тканей *Rauwolfia serpentina* Benth. // Растит. ресурсы. – 1979. – 15, –№ 4. – С. 516–526.
41. Кунах В.А., Алпатов Л.К., Можилевська Л.П. Живильне середовище для одержання і вирощування калюсних тканин рослин: Патент України № 10338А. Опубл. 25.12.1996. Бюл. № 4.
42. Кунах В.А., Можилевская В.А., Потапчук Е.А., Музыка В.И., Колонина И.В. Получение культуры тканей *Ungernia victoris* и ее особенности при выращивании на питательных средах различного состава // Биотехнология. 2007. – № 1. – С. 14–21.
43. Кунах В.А., Левенко Б.А. Модификация метода давленных препаратов для изучения хромосом в клетках культуры тканей растений // Цитология и генетика. 1975. – 9, № 1. – С. 56–58.
44. Ходжиматов М. Дикорастущие лекарственные растения Таджикистана. – Душанбе: Гл. науч. ред. Тадж. Сов. Энциклопедии, 1989. – 368 с.