

Індукція калюсоутворення *in vitro* з експлантів рідкісних і зникаючих видів орхідей

ОЛЕНА АНАТОЛІВНА ШЕЙКО
ЛЮДМИЛА ІВАНІВНА МУСАТЕНКО

Шейко О.А., Мусатенко Л.І. (2013). **Індукція калюсоутворення *in vitro* з експлантів рідкісних і зникаючих видів орхідей.** *Чорноморськ. бот. ж.*, 9 (4): 595-604.

Дослідження по розробці методів збереження представників род. *Orchidaceae* Juss., ареали і чисельність яких швидко знижується, мають особливу актуальність. Разом з традиційними способами збереження рослин *ex situ* все більшого значення набуває використання біотехнологічних методів. Наша робота присвячена розробці і вдосконаленню методів культури ізольованих тканин і органів орхідних флори України для використання у системі збереження і відновлення рослинних ресурсів. У результаті проведених досліджень були отримані калюсні культури з вегетативних і генеративних органів 11 видів орхідних. Вперше встановлено взаємозв'язок між інтенсивністю калюсогенезу з експлантів вегетативних і генеративних органів орхідних та вмістом і співвідношенням складових фітогормонального комплексу на певних етапах онтогенезу, що необхідно враховувати при розробці методів клонального мікророзмноження цих видів. Показано, що максимальна частота калюсогенезу за даних умов культивування є характерною для генеративних органів орхідей, які відрізняються підвищеним вмістом ендогенних цитокінінів і індолілоцтової кислоти та низьким рівнем абсцизової кислоти.

Ключові слова: *Orchidaceae*, культура *in vitro*, експлант, калюсогенез, фітогормони

SHAYKO O.A., MUSATENKO L.I. (2013). **The induction callus formation *in vitro* from explants of rare and endangered orchid.** *Chornomors'k. bot. z.*, 9 (4): 595-604.

Studies on the development of preservation methods for the representatives of *Orchidaceae* Juss. family, whose natural habitats and numbers are considerably decreasing are very urgent today. Along with the traditional techniques of plant preservation *ex situ* biotechnological methods used for these purposes are becoming more and more important. These work investigations dealt with the development and improvement of the methods of isolated orchid tissue culture of Ukraine flora in order to apply them in the system of plant resources preservation and procreation. As a result there were obtained callus cultures of vegetative and generative organs of 11 wild orchid species. For the first time there was found the interrelation between the callusogenesis from explants of orchid vegetative and generative organs and ratio of the phytohormonal complex components at the specific stages of the ontogenesis that must be taken into account during the development of methods of these species clonal micropropagation. The maximum frequency of callusogenesis in specific cultivation conditions was shown to be characteristic of the orchid generative organs which have a high content of cytokinins, IAA and low level of ABA.

Key words: *Orchidaceae*, culture *in vitro*, explants, callusogenesis, phytohormones

Шейко Е.А., Мусатенко Л.И. (2013). **Индукция каллусообразования *in vitro* из эксплантов редких и исчезающих видов орхидей.** *Черноморск. бот. ж.*, 9 (4): 595-604.

Исследования по разработке методов сохранения представителей сем. *Orchidaceae* Juss., ареалы и численность которых быстро снижается, имеют особую

актуальність. Вместе с традиционными способами сохранения растений *ex situ* все большее значения приобретают биотехнологические методы. Наша работа посвящена разработке и усовершенствованию методов культуры изолированных тканей и органов орхидных флоры Украины для использования в системе сохранения и возобновления растительных ресурсов. В результате проведенных исследований были получены каллусные культуры из вегетативных и генеративных органов 11 видов орхидных. Впервые установлена взаимосвязь интенсивности каллусогенеза из эксплантов вегетативных и генеративных органов орхидных и соотношения составляющих фитогормонального комплекса на определенных этапах онтогенеза, что необходимо учитывать при разработке методов клонального микроразмножения этих видов. Показано, что максимальная частота каллусогенеза в определенных условиях культивирования характерна для генеративных органов орхидей, которые отличаются повышенным содержанием цитокининов, индолилуксусной кислоты и низким уровнем абсцизовой кислоты.

Ключевые слова: Orchidaceae, культура *in vitro*, эксплант, каллусогенез, фитогормоны

Вступ

Усі види род. *Orchidaceae* Juss. флори України є рідкісними та зникаючими [СОВКО, 2007]. Вони характеризуються складним і тривалим життєвим циклом, під час якого має місце взаємодія з грибами-мікоризоутворювачами і високоспеціалізованими запилювачами [СЕРЕВЧЕНКО, БУЮН, КОВАЛЬСКАЯ, 2010; TREMBLETT, ASKERMAN, ZIMMERMAN, CALVO, 2005]. Це обумовлює високу вразливість до дії кліматичних та антропогенних чинників [GRODZINSKIY, SHELYAG-SOSONKO, СЕРЕВЧЕНКО, 2001; БУЮН, 2011]. У природі від проростання насіння до першого цвітіння орхидних проходить, в залежності від виду та умов існування, від 4 до 15 років за загальної тривалості життєвого циклу від 20 до 30 років. Крім того, у процесі розвитку більшість видів здатна переходити до стану спокою на декілька років. Тому їх збереження потребує розробки ефективних методів прискореного розмноження та введення в культуру.

Одним із шляхів збереження генофонду орхидних в умовах культури є клональне микророзмноження. Цей метод дозволяє контролювати чинники навколишнього середовища. Він забезпечує широке впровадження модельних систем культури рослинних тканин *in vitro* для подальших теоретичних та прикладних досліджень морфогенезу – актуальної проблеми сучасної біології [БУЮН, 2011; FAY, CHASE, 2009]. Такі методи розроблено для окремих видів орхидних, в тому числі і видів флори України [SWARTS, DIXON, 2009; ПОРКОВА, МИТРОПАНОВА, 1997; ПОРКОВА, 2001]. Розробка ефективних методів розмноження та збереження рідкісних і зникаючих видів орхидей потребує комплексного вивчення їхньої біології, онтогенезу, еколого-фізіологічних особливостей *in situ* й створення умов для культивування *in vitro*.

Серед методів клонального микророзмноження розрізняють активацію вже існуючих меристем та індукцію виникнення організованих структур (бруньок чи ембріодів) *de novo* безпосередньо з ізолюваних тканин експлантів чи первинного каллусу. Регенерація рослин *in vitro* може здійснюватися за одним із трьох шляхів морфогенезу (ембріогенез, соматичний ембріогенез, геморізогенез), які супроводжуються етапами органо- і гістогенезу [BUTENKO, 1964, 1999; GUMEROVA, САНУЕНКОВА, GATINA, RUMYANCEVA, 2003; KALLERHOFF, ALIBERT, 2003; KLERK, 2003]. Регенерація тканин шляхом геморізогенезу можлива пагонами, які утворюються з додаткових бруньок; безпосередньо з тканин експланту або із каллусу, утвореного на експланті [KLERK, 2003]. Успіх микророзмноження залежить від генотипу і стану донорної рослини, розміру і морфогенетичного потенціалу експланту та особливостей введення в культуру *in vitro* (режим стерилізації, умови культивування, склад живильного середовища і вміст у ньому регуляторів росту) [KRUGLOVA, 2007; LEELA,

NARESH, SRIKANTH, 2011]. Основною метою наших досліджень була розробка та вдосконалення методів індукції калюсоутворення з органів і тканин орхідних для подальшого використання у системі розмноження рідкісних і зникаючих видів.

Матеріали і методи дослідження

Об'єктами досліджень були дикорослі орхідеї (род. *Orchidaceae*) флори України: кореневищні (булатка великоквіткова (*Cephalanthera damasonium* (Mill.) Druce), коручка чемерникоподібна (*Epipactis helleborine* (L.) Crantz), гніздівка пташина (*Neottia nidus-avis* (L.) Rich.) та бульбоносні (плодоріжка пірамідальна (*Anacamptis pyramidalis* (L.) Rich.), плодоріжка розмальована (*Anacamptis picta* (Loisel.) R.M. Bateman), кримсько-кавказький ендем ремнепелюстник козячий (*Himantoglossum caprinum* (M. Bieb.) K. Koch), любка зеленоквіткова (*Platanthera chlorantha* (Cust.) Rchb.), реліктовий вид для України – офрис оводоносна (*Ophrys oestrifera* M. Bieb.), зозулинець пурпуровий (*Orchis purpurea* Huds.), зозулинець мавпячий (*Orchis simia* Lam.), зозулинець тризубчастий (*Orchis tridentata* Scop.) [CHERVONA..., 2009].

Експедиційними дослідженнями було охоплено центральний район головного гірського пасма та західний район Південного берега Криму. Для визначення морфогенетичних потенцій природного рослинного матеріалу в умовах *in vitro* було використано всі основні органи орхідей за винятком бульб, а саме: генеративні (насінні зачатки, зав'язі, пиляки, сегменти пелюсток) і вегетативні (сегменти стебла, листків). Експланти було відібрано в період вегетації (листки, стебла), на початку цвітіння (пелюстки, пиляки) та на 25-й день після запилення (зав'язі, насінні зачатки). Основною умовою відбору первинних експлантів було цілковите збереження природних ценопопуляцій.

В експериментах з вивчення морфогенетичних потенцій орхідних використовувались поживні середовища: для зав'язей – Мурасіге-Скуга, для насінних зачатків і пиляків – Ніча і Ніч, для стебла – Кнудсона С при рН 5,6–5,8 [BUTENKO, 1964; CHEREVCHENKO, KUSHNIR, 1986].

Для приготування твердих живильних середовищ використовували агар-агар (фірма «МЗХР», Барнаул, Россия) у кількості 7–8 г/л. Агар розчиняли безпосередньо перед використанням в половинному об'ємі дистильованої води, а потім додавали до середовища. Встановлено, що морфогенез визначається балансом екзогенних цитокінінів та ауксинів [KRUGLOVA et al., 2006], тому у наших дослідженнях у якості основних факторів дедиференціації використовувались індолілолійна кислота (ІОЛК), 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота (2,4-Д) та 6-бензиламінопурин (6-БАП) в концентраціях від 0,5 мг/л до 3,0 мг/л (табл. 1).

Розчини регуляторів росту готували у розрахунку 1 мг на 1 мл розчину. 6-БАП спочатку розчиняли в невеликій кількості 1 н NaOH, ауксини (ІОЛК, 2,4-Д) – в 0,1 мл етанолу, а потім доводили до необхідного об'єму бідистильованою водою. Розчини регуляторів росту зберігали при температурі –10 °С (не більше 7 діб).

Стерилізація експлантів і поживних середовищ. Всі маніпуляції з ізольованими тканинами (введення в культуру, пересадка на свіже поживне середовище) проводили в асептичному приміщенні – ламінарному боксі (GELAIRE TC 48, Німеччина) стерильними інструментами. Чистий посуд, попередньо загорнутий в папір або фольгу, інструменти, папір, вату стерилізували у сушильній шафі (LP-301, Венгрія) при температурі 160 °С протягом 1,5–2 годин. Поживні середовища стерилізували в автоклаві при температурі 120 °С і тиску 0,75–1 атм. протягом 30 хв.

Таблиця 1

Варіанти кількісного співвідношення екзогенних регуляторів росту у поживних середовищах для культивування надземних органів орхідей *in vitro*

Table 1

Variants of the quantitative correlation of exogenous regulator growth on nutrient medium for cultivation orchids organs *in vitro*

Варіант поживного середовища	Вміст екзогенних регуляторів росту, мг/л		
	6-БАП	2,4-Д	ІОЛК
I	–	–	–
II	0,5	–	–
III	1,5	1,5	1,5
IV	2,0	1,5	–
V		–	2,0
VI		2,5	–
VII		3,0	–
VIII	2,5	1,5	–
IX		–	3,0
X	3,0	–	2,0
XI		–	2,5

Для пиляків використовували стерилізацію 70% C₂H₅OH протягом 1 хв, для зав'язей – подвійну стерилізацію 80% C₂H₅OH (1,5 хв) разом з 15% H₂O₂ (2 хв), для стерилізації насінних зачатків – також подвійну стерилізацію 70% C₂H₅OH (2 хв) разом з 15% H₂O₂ (3 хв), для отримання асептичної культури сегментів стебла – 0,1% HgCl₂ з експозицією 10 хв, листків – 70% C₂H₅OH разом з 10% Ca(ClO)₂ протягом 3 і 5 хв, для стерилізації пелюсток – подвійну стерилізацію 7% хлораміном Б (5 хв) разом 15% H₂O₂ (5 хв). Для отримання асептичної культури частину рослини, з якої брали експлант, промивали водою з милом і змивали чистою водою, потім рослинний матеріал стерилізували в розчинах дезінфікуючих речовин. До стерилізуючого розчину додавали емульгатор Твін-20 (одну каплю на 100 мл розчину). Після витримання експлантів у дезінфікуючих речовинах їх багаторазово промивали в бідистильованій воді. Поверхневі шари клітин на зрізах, які могли пошкодитись при стерилізації, видаляли.

Експланти вирощували у культуральній кімнаті, де підтримувалась постійна температура в межах 20–25°C, 16-годинний фотоперіод з освітленням 1000–3000 лк і відносній вологості повітря 70%. Культивування отриманих з експлантів калюсних тканин проводили в термостаті (BT-120, Польща) при відсутності освітлення і в фотолюміністаті (ФСЛ-В, Росія) в таких же умовах, як і для експлантів.

Мікроскопічні дослідження проводили на мікроскопах МББ-1 (Росія) (збільшення x8; x20; x90), а також за допомогою бінокюляра БМ-51-2 (Росія). Мікрофотографії зроблені за допомогою фотонасадки МФН-11 (Росія) на фотоплівку «Kodak-200».

Всі отримані результати обробляли статистично за допомогою комп'ютерної статистичної програми Excel ліцензійного пакету Microsoft Office 2007 [LACHLAN, 2009; KOROSOV, GORVACH, 2007]. В таблицях і на рисунках подано середні арифметичні та їхні статистичні похибки. Достовірність різниці оцінювали за критерієм Ст'юдента, використовуючи 5% рівень значущості (P≤0,05).

Результати дослідження та їх обговорення

Сучасний рівень прикладних методик біотехнології рослин дозволяє використовувати як експланти практично будь-який орган інтактної рослини, хоча при виборі експланту все-таки необхідно враховувати генотип, фізіологічний стан та фазу онтогенезу інтактної рослини, а також походження тканини експланту, його розмір і

локалізацію [BUTENKO, 1964; 1999; EGOROVA, KLUNOVA, ZHIVUCHINA, 2003; KRUGLOVA, SELDIMIROVA, ZAYCEV, KATASONOVA, 2006]. Було проведено скринінг оптимальних експлантів з вегетативних та генеративних органів орхідей для введення в культуру *in vitro*. Високий морфогенетичний потенціал стебла визначається, ймовірно, його фізіолого-біохімічними особливостями: по-перше, значна кількість клітин, які входять до складу провідних елементів, тривалий проміжок часу, а іноді протягом всього життя рослини, зберігають здатність до поділу; по-друге, атрагуючі властивості елементів провідної системи; по-третє, елементи провідної системи експланту стебла дозволяють швидше відновити контакт із живильним середовищем. Розміри досліджених нами експлантів варіювали від 5 до 20 мм. Експланти стебла розміром 5–20 мм залишалися стерильними, розміром 5–15 мм – життєздатними (рис. 1). Проліферація спостерігалась у експлантів розміром 5–10 мм.

Відомо, що листок – орган з великою кількістю меристематичних клітин, що самостійно диференціюють, і його ізоляція призводить до порушення цілісності, перебудови життєдіяльності тканин і активації гідролітичних процесів. Такі зміни сприяють збільшенню рухливості речовин в тканинах і посиленню регенеративних процесів в ізольованих листках [EGOROVA, KLUNOVA, ZHIVUCHINA, 2003; CHEREVCHENKO, LAVRENTIEVA, IVANNIKOV, 2008]. Експланти листка орхідей розміром 5–20 мм протягом всього часу культивування залишались стерильними. Некротичні зміни спостерігалися у експлантів розміром 5–10 мм. У життєздатних експлантів листка розміром 15–20 мм проліферацію не було зафіксовано (рис. 1).

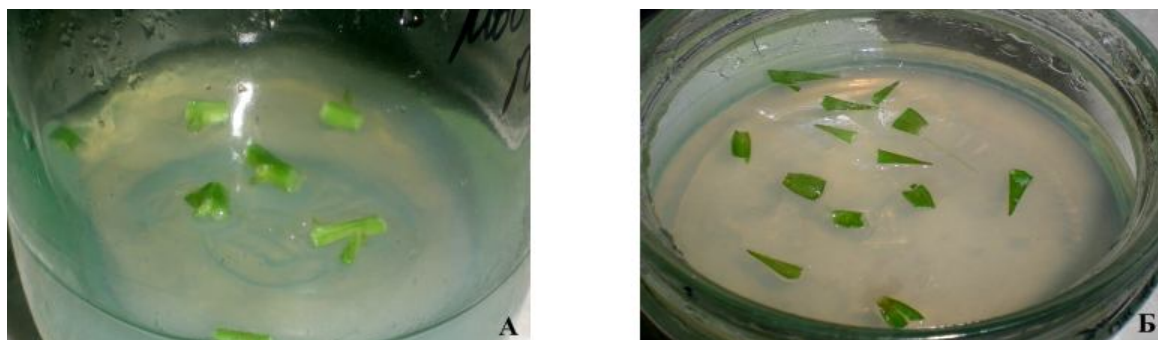


Рис. 1. Культура *in vitro* експлантів з сегментів стебла (А) і листків (Б) *Epipactis helleborine*.

Fig. 1. Culture *in vitro* of stems (A) and leafes segment (B) explants of *Epipactis helleborine*.

Впродовж двох місяців культивування експланти пелюсток розміром 15–20 мм зберігали стерильність і життєздатність, однак не проліферували. Стерильні експланти пелюсток розміром 5–10 мм через місяць піддавалися некрозу.

При культивуванні експлантів зав'язей розміром 15–20 мм вони залишалися стерильними, однак не виявляли життєздатності і швидко гинули, а стерильні експланти зав'язей розміром 5–10 мм зберігали життєздатність та проліферували (рис. 2). Генетично зав'язь має підвищену життєздатність і високу пластичність. Проліферація зав'язі, як органу генеративної сфери, можливо, пов'язана з високим морфогенетичним потенціалом значної кількості меристематичних тканин, в тому числі й апікальних. Культивування пиляків і насінних зачатків показало найкращі результати, оскільки всі стерильні експланти залишалися життєздатними та добре проліферували (рис. 2).

Таким чином, за результатами проведеного скринінгу для введення в культуру *in vitro* за рядом показників було відібрано життєздатні експланти оптимального розміру (сегменти стебла та зав'язі розміром 5–10 мм), отримані із стебла і зав'язі,

насінних зачатків та пиляків *Epipactis helleborine*, що зберігали стерильність та проліферували. Життєздатні експланти пелюсток та листків за даних умов не проліферували, тому для введення в культуру *in vitro* не використовувались.



Рис. 2. Культура *in vitro* експлантів з зав'язей (А) і пиляків (Б) *Epipactis helleborine*.

Fig. 2. Culture *in vitro* of ovaries (A) and anther (B) explants of *Epipactis helleborine*.

Найважливішу роль в індукції поділу клітин експланту, утворенні калюсу та морфогенезі відіграють регулятори росту. Створення оптимального рівня екзогенних регуляторів росту – необхідна умова отримання калюсу, органів рослин, ембріодів та регенерації рослин. Індивідуальний характер синтезу ендогенних фітогормонів рослинними тканинами обумовлює широку варіабельність реакцій на зовнішні гормональні фактори, тому формулювання загального правила відносно концентрацій і співвідношень гормонів у поживному середовищі для культивування рослинних експлантів різного походження неможливе і потребує ретельного підбору [BUTENKO, 1999; РОРКОВА, МІТРОПАНОВА, 1997; РОРКОВА, 2001].

Дослідження по підборі оптимальних концентрацій та співвідношень регуляторів росту у поживному середовищі за даних умов культивування показали, що максимальна частота калюсогенезу спостерігається на поживних середовищах, у яких зберігається таке ж співвідношення цитокінінів і ауксинів, як і для інтактного органу [WU, CHEN, CHANG, 2004; SHEYKO, 2011]. З таблиці 2 видно, що у *O. oestrifera*

Таблиця 2

Залежність калюсогенезу експлантів орхідних від співвідношення ендогенних та екзогенних цитокінінів і ауксинів

Table 2

Dependence of explants callusogenesis on correlation of endogenous and exogenous cytokinin and IAA

Вид	Експлант	Цитокініни/ауксини		Частота калюсогенезу, %
		Ендогенні	Екзогенні	
<i>Ophrys oestrifera</i>	Зав'язь	1,7	1,7	29,9 ± 1,5
	Стебло	1,7	1,7	12,2 ± 0,6
<i>Cephalanthera damasonium</i>	Зав'язь	1,5	1,5	23,9 ± 1,1
	Стебло	1,5	1,5	9,3 ± 0,4
<i>Himantoglossum caprinum</i>	Зав'язь	1,5	1,5	34,6 ± 1,7
	Стебло	1,5	1,5	10,7 ± 0,5

максимальна частота калюсогенезу спостерігається при культивуванні на поживному середовищі з додаванням екзогенних цитокінінів і ауксинів у співвідношенні 1,7, що є характерним для інтактних органів. Для експлантів з зав'язей і стебла *C. damasonium* і *H. caprinum* таке співвідношення складало 1,5. При культивуванні на поживних

середовищах з іншими кількісними співвідношеннями регуляторів росту частота калюсогенезу була значно меншою і не перевищувала 10%.

У результаті проведених нами досліджень було отримано калюсну культуру із стебла, зав'язей, насінних зачатків та пиляків орхідей (рис. 3). Максимальна частота калюсогенезу у досліджуваних видів орхідей спостерігалася при культивуванні експлантів зав'язей, насінних зачатків і пиляків (до 40%), а мінімальна – при культивуванні експлантів стебла (до 14%). Це, можливо, обумовлено підвищеним вмістом ендогенних фітогормонів, а саме індоліл-3-оцтової кислоти (ІОК) та цитокінінів (ЦТК), у генеративних органах орхідей порівняно з вегетативними, в яких було зафіксовано підвищений вміст абсцизової кислоти (АБК) [ШЕУКО, 2011]. Цей факт підтверджує залежність морфогенетичного потенціалу експланту від вмісту ендогенних фітогормонів.

Таким чином, у результаті проведених досліджень було показано вплив екзогенних фітогормонів на частоту калюсогенезу експлантів з вегетативних та генеративних органів орхідей та відібрано поживні середовища з оптимальними кількісними співвідношеннями цитокінінів та ауксинів для культивування органів і тканин орхідних *in vitro*. Встановлено спряження між вмістом ендогенних фітогормонів інтактних органів орхідних на певних етапах онтогенезу та інтенсивністю калюсогенезу з експлантів цих органів.

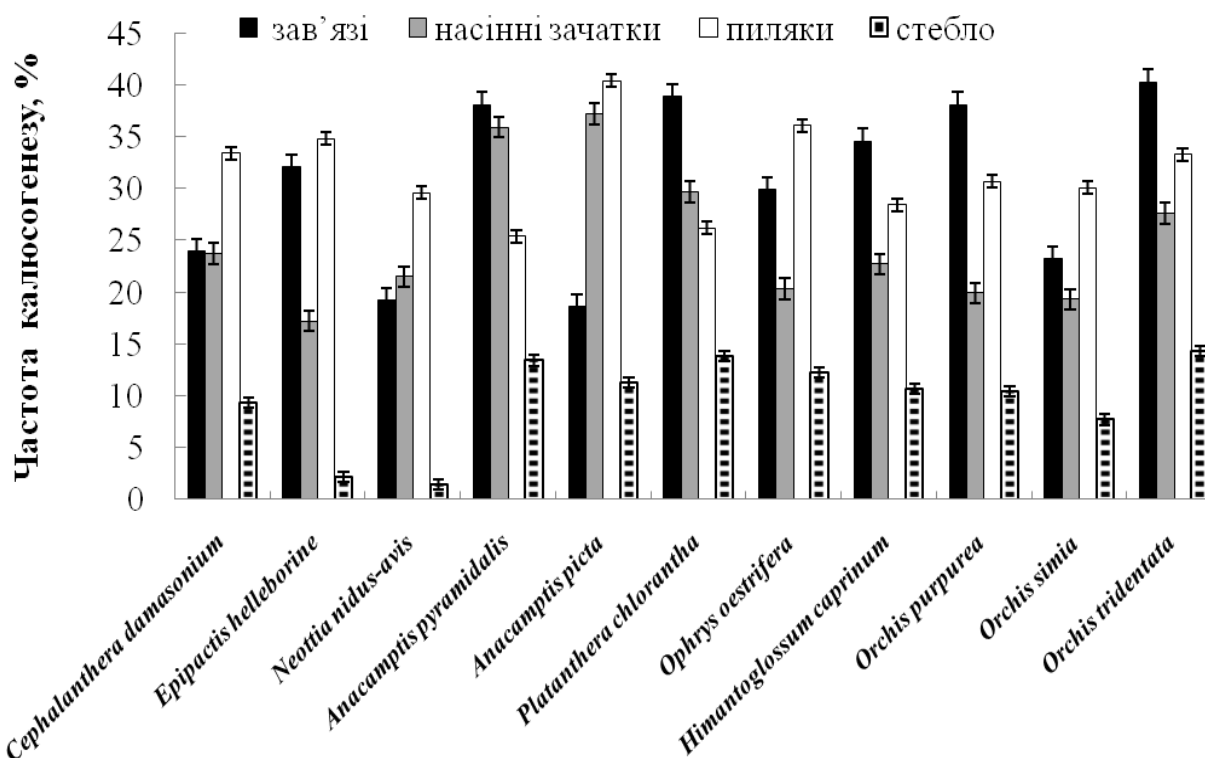


Рис. 3. Частота калюсогенезу з різних типів експлантів орхідних.

Fig. 3. Frequency of callus formation from different orchid explants.

Дослідження морфогенетичного потенціалу клітин експлантів вирішує проблеми відновлення та розмноження квіткових рослин та створення високоефективних технологій масового отримання рослин рідкісних і ендемічних видів [ТЕРЛІТСКАУА, ШЕУКО, ЛОВКО, 2007]. Із експлантів зав'язей, насінних зачатків та пиляків було отримано переважно морфогенні типи калюсу – компактні, вузловаті, щільні; калюси з експлантів стебла були переважно неморфогенні – м'які, рихлі, водянисті.

Цитологічний аналіз цих калюсних культур показав ряд специфічних особливостей, до яких можна віднести значну структурну гетерогенність, наявність різних за морфологією типів утворень, а також зв'язок морфологічних ознак окремих утворень з їхніми морфогенетичними потенціалами.

У калюсах зав'язей, насінних зачатків та пиляків також було виявлено дрібні клітини з великими ядрами, які локалізувалися групами та утворювали меристематичні осередки (рис. 4). Поява меристематичних осередків вказувала на початок процесів вторинної диференціації у калюсних тканинах. Поділ клітин меристематичних осередків призводив до утворення лігніфікованих елементів судин та трахеїд (рис. 4).

Інший шлях морфогенезу в меристематичних осередках – це спонтанний ембріогенез. Калюсна клітина покривалася щільною оболонкою і відокремлювалася від оточуючих клітин, збільшувалась та змінювала забарвлення. Така клітина підлягала чітко спрямованому поділу, в результаті закладання орієнтованих клітинних перегородок утворювалися чотирьохклітинний (тетрада), а потім багатоклітинний ембріоїди (рис. 5).

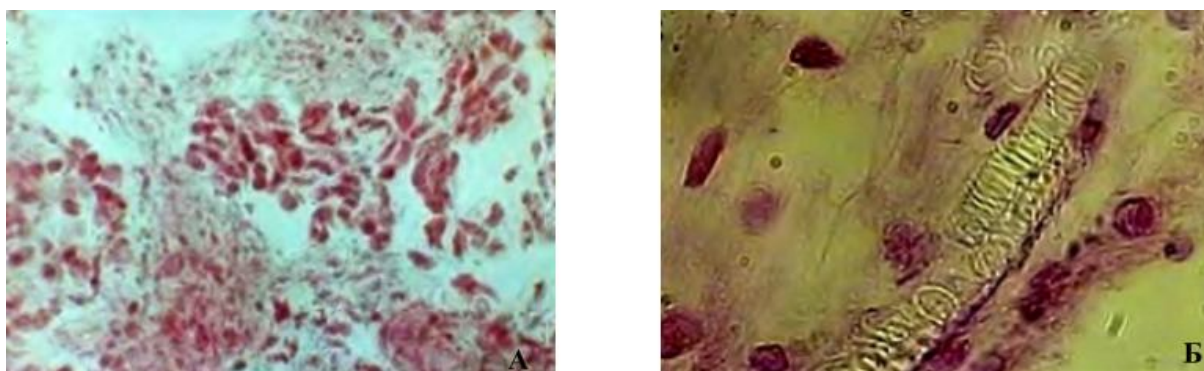


Рис. 4. Меристематичні осередки (А) та початок гістогенезу (Б) в калюсній культурі орхідних.

Fig. 4. Meristematic places (A) and beginning of gystogenesis (B) on callus culture of orchids.

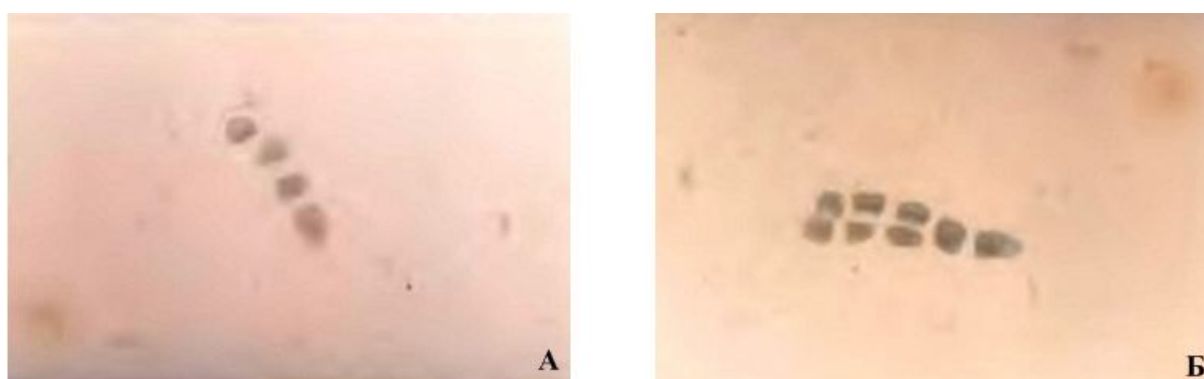


Рис. 5. Чотирьохклітинний і багатоклітинний ембріоїди у калюсній культурі орхідних.

Fig. 5. Fourcellular and eightcellular embrioides on callus culture of orchids.

Висновки

Таким чином, у результаті проведених досліджень отримано калюсні культури з вегетативних і генеративних органів орхідей, цитоморфологічний аналіз яких показав великий морфогенетичний потенціал калюсних культур зав'язей, насінних зачатків та пиляків у зв'язку з появою меристематичних осередків та соматичних ембріоїдів. Встановлено спряження між вмістом ендогенних фітогормонів інтактних органів

орхідних на певних етапах онтогенезу та інтенсивністю калюсогенезу з експлантів цих органів. Виявлено, що максимальна частота калюсогенезу характерна для експлантів, отриманих з генеративних органів орхідей Вони відрізняються підвищеним вмістом ендогенних цитокінінів і індолілоцтової кислоти й низьким рівнем абсцизової кислоти. Результати досліджень свідчать про перспективність методів клонального мікророзмноження рідкісних та зникаючих видів рослин, зокрема орхідей, для забезпечення збереження генофонду орхідних флори України.

References

- BUTENKO R.G. (1964). Kultura izolirovaniykh tkaney i fiziologiya morphogeneza rasteniy / Otv. red. M.N. Chilachyan. M.: Nauka. 272 p. [БУТЕНКО Р.Г. (1964). Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Отв. ред. М.Х. Чайлахян. М.: Наука. 272 с.]
- BUTENKO R.G. (1999). Biologiya kletok vysshykh rasteniy *in vitro* i biotekhnologii na ikh osnove: ucheb. posobie. M.: FBK-PRESS. 160 p. [БУТЕНКО Р.Г. (1999). Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. пособие. М.: ФБК-ПРЕСС. 160 с.]
- BUYUN L.I. (2011). *Studia Biologica*, **5** (1): 173-188. [БҮЮН Л.І. (2011). Сучасні погляди на екологічну спеціалізацію родини *Orchidaceae* Juss. *Studia Biologica*, **5** (1): 173-188]
- CHEREVCHENKO T.M., BUYUN L.I., KOVALSKAYA L.A. (2010). *Ukr. botan. zhurn.*, **5**: 637-649. [ЧЕРЕВЧЕНКО Т.М., БҮЮН Л.І., КОВАЛЬСЬКА Л.А. (2010). Запилувальні стратегії у орхідних (*Orchidaceae* Juss.). *Укр. ботан. журн.*, **5**: 637-649]
- CHEREVCHENKO T.M., KUSHNIR G.P. (1986). *Orkhidei v kulture*. K.: Nauk. dumka. 198 p. [ЧЕРЕВЧЕНКО Т.М., КУШНИР Г.П. (1986). Орхідеї в культурі. К.: Наук. думка. 198с.]
- CHEREVCHENKO T.M., LAVRENTIEVA A.N., IVANNIKOV R.V. (2008). *Biotechnologiya tropicheskikh i subtropicheskikh rasteniy in vitro*. K.: Nauk. dumka. 560 p. [ЧЕРЕВЧЕНКО Т.М., ЛАВРЕНТЬЄВА А.Н., ІВАННИКОВ Р.В. (2008). Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro*. К.: Наук. думка. 560 с.]
- CHERVONA knyga Ukrainy. Roslinnyi svit. Vidp. red. YA. P. Didukh. (2009). K.: Globalkonsalting. 900 p. [ЧЕРВОНА книга України. Рослинний світ / Відп. ред. Я.П. Дідух. (2009). К.: Глобалконсалтинг. 900 с.]
- EGOROVA T.A., KLUNOVA S.M., ZHIVUCHINA E.A. (2003). *Osnovy biotekhnologii*. M.: Academiya. 208 p. [ЕГОРОВА Т.А., КЛУНОВА С.М., ЖИВУХИНА Е.А. (2003) Основы биотехнологии. М.: Академия. 208 с.]
- FAY M.F., CHASE M.W. (2009). Orchid biology: from Linneus via Darwin to the 21st century. *Ann. Bot.*, **104**: 359-364.
- GRODZINSKIY D.M., SHELYAG-SOSONKO Y.R., CHEREVCHENKO T.M. (2001). Problemy zberezhenya ta vidnovlenya bioriznomanittya v Ukraini. K.: Vidav. dim «Akademperiodika». 105 p. [ГРОДЗИНСЬКИЙ Д.М., ШЕЛЯГ-СОСОНКО Ю.Р., ЧЕРЕВЧЕНКО Т.М. та ін. (2001). Проблеми збереження та відновлення біорізноманіття в Україні. – К.: Видавн. дім «Академперіодика». 105 с.]
- GUMEROVA E.A., SANUENKOVA S.A., GATINA E.A., RUMYANCEVA N.I. (2003). *Phiziologiya rasteniy*, **50** (5): 716-721. [ГУМЕРОВА Е.А., ЧУЕНКОВА С.А., ГАТИНА Е.А., РУМЯНЦЕВА Н.І. (2003). Соматический эмбриогенез и геммогенез в культуре гипокотилей *Fagopirum Esculentum* Moench. *Физиология растений*, **50** (5): 716-721]
- KALLERHOFF J., ALIBERT G. (2003). Tissue culture. Somatic Embryogenesis. Encyclopedia of Applied Plant Sciences [Ed. Brian Thomas]. Wellesbourne: Academic Press. 1372-1379.
- KLERK G.J. (2003). Tissue culture. Organogenesis. Encyclopedia of Applied Plant Sciences [Ed. Brian Thomas]. Wellesbourne: Academic Press. 1364-1371.
- KOROSOV A.V., GORBACH V.V (2007). *Kompyuternaya obrabotka biolohicheskikh dannykh: metod. posobie*. Petrozavodsk: PetrGU. 76 p. [КОРОСОВ А.В., ГОРБАЧ В.В. (2007). Компьютерная обработка биологических данных: метод. пособие. Петрозаводск: ПетрГУ. 76 с.]
- KRUGLOVA N.N. (2007). *Citologiya*, **49** (9): 762-763. [КРУГЛОВА Н.Н. (2007). Морфогенез *in vitro* клеток каллусов различного происхождения. *Цитология*, **49** (9): 762-763]
- KRUGLOVA N.N., SELDIMIROVA O.A., ZAYCEV D.Y., KATASONOVA A.A. (2006). *Izv. Chelyab. NC UrO RAN*, **2** (32): 94-98. [КРУГЛОВА Н.Н., СЕЛЬДИМИРОВА О.А., ЗАЙЦЕВ Д.Ю., КАТАСОНОВА А.А. (2006). Биотехнологическая оценка экспланта для получения растений-регенерантов яровой пшеницы в культуре *in vitro* в целях адаптивной селекции в условиях Южного Урала. *Иzv. Челяб. НЦ УрО РАН*, **2** (32): 94-98]
- LACHLAN B.W. (2009). *Matematical Biology Research Trends*. New York: Nova Science Publishers. 312 p.
- LEELA T., NARESH B., SRIKANTH M. (2011). Morphological, physic-chemical and micropropagation studies in *Jatropha curcas* L. and RAPD analysis of the regenerants. *Applied Energy*, **88** (6): 2071-2079.
- POPKOVA L.L. (2001). *Tr. Nikit. botan. sada*, **120**: 41-53. [ПОПКОВА Л.Л. (2001). Орхидные Крыма: биология,

- экология, охрана. *Тр. Никит. ботан. сада*, **120**: 41-53]
- ПОРКОВА L.L., МИТРОФАНОВА O.V. (1997). *Biotehnologicheskie issledovaniya sadovih I drugih cennih mnogoletnih kultur*, **119**: 168-181. [ПОПКОВА Л.Л., МИТРОФАНОВА О.В. (1997). Морфогенез некоторых орхидных Крыма при семенном размножении в условиях *in vitro*. *Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур*, **119**: 168-181]
- SHEYKO O.A. (2011). *Phytohormony dykoroslykh orkhidnykh ta vvedennya ikh v kulturu in vitro*: Avtoreph. diss. ... kand. biol. nauk.: 03.00.12 / Institut fiziologii rasteniy i genetiki NAN Ukraini. R.: 20 p. [ШЕЙКО О.А. (2011). Фітогормони дикорослих орхидних та введення їх в культуру *in vitro*: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.12 / Інститут фізіології рослин і генетики НАН України. К.: 20 с.]
- СОВКО V.G. (2007). *Stezhynamy Chervonoyi knygy Ukrainy*. K.: Urozhai. 280 p. [СОБКО В.Г. (2007). Стежинами Червоної книги. К.: Урожай. 280 с.]
- SWARTS N.D., DIXON K.W. (2009). Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Ann. Bot.*, **104** (3): 543-556.
- ТЕПЛИЦКАЯ L.M., SHEYKO E.A., LOVKO V.N. (2007). *Uch. zapiski Tavricheskogo nac. un-ta im. V.I. Vernadskogo. Seriya «Biologiya, chimiya»*, **3**: 79-86. [ТЕПЛИЦКАЯ Л.М. ШЕЙКО Е.А., ЛОВКО В.Н. (2007). Культура пыльников орхидных *in vitro* и ее морфогенетический потенциал. *Уч. записки Таврического нац. ун-та им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия»*, **3**: 79-86]
- TREMBLETT R.L., ACKERMAN J.D., ZIMMERMAN J.K., CALVO R. (2005). Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences a spasmodic journey to diversification. *Biol. J. Linnean Soc.*, **84**: 1-54.
- WU I-F., CHEN J.-T., CHANG W.-C. (2004). Effects of auxins and cytokinins on embryo formation from root-derived callus of *Oncidium* «Gower Ramsey». *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, **1**: 107-109.

Рекомендує до друку
І.І. Мойсієнко

Отримано 01.07.2013 р.

Адреса авторів:

О.А. Шейко
Л.І. Мусатенко
Інститут ботаніки ім. М.Г. Холодного
НАН України
вул. Терещенківська, 2
м. Київ
01601
e-mail: lenasheyko@mail.ru
e-mail: phytohormonology@ukr.net

Authors' address:

O.A. Sheyko
L.I. Musatenko
M.H. Kholodnyi Botanical Institute
NAN of Ukraine
2, Tereshenkivska str.
Kyiv
01601
e-mail: lenasheyko@mail.ru
e-mail: phytohormonology@ukr.net