

УДК 633. 72 : 578. 083

UDC 633. 72 : 578. 083

03.00.00 Биологические науки

Biology

**КУЛЬТУРАЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ  
ИНДУКЦИИ ГЕММОГЕНЕЗА И  
ПОЛУЧЕНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ  
КЛОНОВ РАСТЕНИЙ ЧАЯ В КУЛЬТУРЕ  
IN VITRO**

**NUTRIENT MEDIUM FOR INDUCTION  
GEMMOGENESIS TO CREATE SOMATIC  
CLONES OF TEA PLANTS IN VITRO CULTURE**

Гвасалия Майя Валериановна  
к.б.н., научный сотрудник лаборатории  
биотехнологии, физиологии и биохимии  
растений  
SPIN-код: 1017-5464, AuthorID: 788711  
*Федеральное государственное бюджетное  
научное учреждение «Всероссийский научно-  
исследовательский институт цветоводства и  
субтропических культур», Россия, 354002, г.  
Сочи, ул. Яна Фабрициуса, 2/28.  
subplod@mail.ru*

Gvasaliya Maya Valerianovna  
Cand. Biol. Sci., science researcher of the Laboratory of  
Plant Biotechnology, Physiology and Biochemistry  
SPIN-code: 1017-5464, AuthorID: 788711  
*Federal State Budget Scientific Institution «All-Russian  
Scientific Research Institute of Floriculture and  
Subtropical Crops». Russia, 354002, Sochi, Jana  
Fabritsiusa str. 2/28. subplod@mail.ru*

В статье представлены первые результаты исследований по изучению соматической изменчивости, которая возникает при культивировании *in vitro* тканей и органов растений чая. В качестве исходного материала был использован морфогенный каллус, изолированный от базальной части микропобегов чая, поскольку каллус повышает вероятность проявления соматической изменчивости. Разработан оптимизированный протокол культуральной среды для индукции геммогенеза и получения соматических клонов в культуре *in vitro*. Морфогенные каллусы, инициированные от базальной части микропобегов чая и субкультивируемые на среде 6 – БАП – 2,5 мл + ГК – 1,0 мл + ТДЗ – 4,0 мл + триптофан – 1000 мг, отличились высокими показателями индукции геммогенеза – 63,3 %. Изучено влияние экзогенных регуляторов роста на морфологические и ростовые показатели каллусной культуры чая *in vitro*

The article presents the first results of studies of somaclonal variability, which take place during cultivation of tea plants tissues and organs in vitro culture. As a starting material, there was used morphogenic callus, isolated from the basal part of tea microshoots, because callus increases somaclonal variability. An optimized protocol of the nutrient medium for induction gemmogenesis to product somatic clones of tea plants in vitro culture was developed. Morphogenesis calluses, initiated from the basal part of tea microshoots and subcultured on the nutrient medium with 6 – BAP – 2,5 ml + gibberellic acid – 1,0 ml + Tidiazuron – 4,0 ml + Tryptophan – 1000 mg, distinguished by high rates of induction of gemmogenesis – 63,3 %. The article studies the effect of exogenous growth regulators on morphological and growth indices of tea callus culture in vitro

Ключевые слова: СОМАКЛОНАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ, РАСТЕНИЕ ЧАЯ IN VITRO, КАЛЛУСНАЯ КУЛЬТУРА, СОМАТИЧЕСКИЕ КЛОНЫ, ГЕММОГЕНЕЗ, КУЛЬТУРАЛЬНАЯ СРЕДА

Keywords: SOMACLONAL VARIABILITY, TEA PLANT IN VITRO, CALLUS CULTURE, SOMATIC CLONES, GEMMOGENESIS, NUTRIENT MEDIUM

**Doi: 10.21515/1990-4665-132-100**

Промышленные насаждения чая влажной субтропической зоны России были заложены в период с 1936 по 1956 гг. и представляют собой семенные посадки различных разновидностей чая, а также грузинских

сортов – популяций К.Е. Бахтадзе [1]. Отличаются они большим разнообразием биологических и хозяйственных признаков, отражающихся на урожайности и качестве готовой продукции. В настоящее время сортовые чайные плантации влажных субтропиков России занимают площадь всего 100 га (из 1428 га) и заложены они одним единственным, сортом Колхида (рис. 1).



Рисунок 1. Сотрудники ФГБНУ ВНИИЦиСК на плантации чая сорта Колхида, п. Уч-Дере, ЗАО «Дагомысчай»

Несмотря на то, что чаеводство располагает достаточно богатым генофондом для закладки новых и реконструкции старых чайных плантаций, он нуждается в пополнении, прежде всего сортами, обладающими не только высокой урожайностью и адаптивностью к местным условиям произрастания, но и содержанием танина и экстрактивных веществ, придающих аромат чайному напитку. В решении вопроса о поэтапном переводе отрасли на сортовое производство важная роль принадлежит исследованиям, направленным на привлечение высокотехнологичных методов селекции. К таким методам относится метод клонального микроразмножения чая в культуре *in vitro*, который был успешно разработан в лаборатории биотехнологии, физиологии и биохимии растений нашего института [2, 3, 4].

Высокий коэффициент размножения (1:4,8 с одного экспланта) позволит в короткие сроки обеспечить производство высокосортным посадочным материалом (рис. 2.).



Рисунок 2. Клональное микроразмножение растений чая в культуре *in vitro*

При выведении новых сортов растений, традиционная селекция обогатилась еще одним методом создания исходного материала. Этот метод основан на соматклональной изменчивости растений, которая возникает при культивировании тканей и органов *in vitro* [5]. Проявлению соматклональной изменчивости способствуют многочисленные экзо и эндогенные факторы: стресс, которому подвергается растение при изолировании эксплантов, длительность содержания растительных тканей *in vitro*, условия и режимы культивирования, наличие в питательной среде фитогормонов, антибиотиков, минеральных солей, углеродного питания, а также видовая принадлежность растений и его генотип [6, 7]. Следует отметить, что в естественных условиях произрастания *in vivo*, чайное растение проявляет высокую пластичность к спонтанному мутированию [8]. В условиях искусственного культивирования *in vitro*, где в качестве дополнительной мутационной нагрузки индуцирующих агентов выступают экзогенные регуляторы роста питательной среды, режимы и условия культивирования – соматклональная изменчивость у растений чая значительно возрастает [9, 10]. В наших исследованиях, при изучении соматклональной изменчивости, в целях получения соматклональных вариантов, в качестве исходного материала был использован морфогенный каллус, изолированный от базальной части микропобегов чая. Выбор пал на каллус, поскольку он является универсальным и легко доступным материалом, используемым в клеточной селекции [11]. Известно, что вероятность проявления соматклональной изменчивости возрастает, если в

ходе культивирования растительных тканей *in vitro* присутствует стадия каллуса. Многие ученые отмечают, что при длительном культивировании генетическая изменчивость гетерогенной ткани каллуса возрастает, в ней происходят хромосомные aberrации, изменение ploидности, и как следствие, возрастает частота мутирования растений по фенотипу и генотипу. Каллус *in vitro* приобретает совершенно новые характеристики, например, он проявляет способность к тотипотентности, индукции геммогенеза и ризогенеза, проходит различные стадии роста и деградации. В результате индукции геммогенеза из каллуса можно получить новые соматические клоны [7, 12, 13, 14]. Соматическая изменчивость способствует выделению новых для селекции генотипов [15, 16, 17]. Проведенные исследования позволяют расширить и поднять на новый уровень селекционные исследования по выведению новых отечественных сортов чая.

**Материалы и методы.** В качестве объекта исследований использовался каллус с меристематическими очагами активности, изолированный от базальной части микропобегов чая, находящихся в течение 6 лет в пересадочной культуре *in vitro*. Базовой питательной средой служила минеральная основа по прописи Мурасиге и Скуга (МС) [18]. Использовались общепринятые приемы по работе с культивируемыми изолированными тканями и органами растений [19, 20]. Все операции, требующие соблюдения условий стерильности, проводились в ламинар – боксах. Каллусы культивировались в условиях фотопериода 16/8 час. свет/темнота, температуре  $25 \pm 1,0$  °С, влажности – 70 %, освещенности 4000 – 5000 лк. (с люминесцентными лампами OSRAM L 36 W/765). Массу каллуса определяли [21] путем взвешивания его в стерильных условиях. Относительный прирост массы каллусной ткани определяли по формуле:  $\Delta W = (W_t - W_0) / W_0 \times 100$  %, где  $\Delta W$  – относительный прирост массы каллуса;  $W_0$  – начальная масса каллуса;  $W_t$  – конечная масса каллуса. В опыте 6 вариантов питательных сред, на основе Мурасиге – Скуга, в сочетании с различными экзогенными регуляторами роста: БАП, НУК, ИУК, ИМК, ГК, 2,4 Д, аденином, ТДЗ, мезоинозитом, триптофаном, энергеном,  $AgNO_3$ , в разных концентрациях, в 3-х повторностях, по 20

образцов в каждой. Контролем служила безгормональная среда МС. Математическая обработка полученных данных проводилась методом Фишера, по Доспехову [22].

**Результаты исследований.** Для индукции геммогенеза, в целях получения соматических клонов чая в культуре *in vitro*, каллус с зонами меристематической активности, был высажен на 6 вариантов питательных сред, с добавлением различных экзогенных регуляторов роста (табл.1).

**Таблица 1.** Влияние питательной среды и экзогенных регуляторов роста на индукцию геммогенеза при культивировании морфогенного каллуса

	Базовая среда МС + разные варианты экзогенных регуляторов роста	Кол-во морфоген- ного каллуса, шт.	Геммогенез, %		количество регенерантов на один каллус, шт.	Индукция геммогенеза, %
			на 20-й день	на 30-й день		
<b>I</b>	6 – БАП – 2,0; 2,4 Д – 1,0; аденин – 0,5; ТДЗ – 1,5 мл	60	3,3	0	3	3,3
<b>II</b>	6 – БАП – 2,5; НУК – 0,5; ИУК – 0,5; мезоинозит – 100 мг; AgNO <sub>3</sub> – 100 мг	60	26,7	0	24	26,7
<b>III</b>	6 – БАП – 1,0 мл; НУК – 0,25 мл; триптофан – 250 мг	60	10,0	0	8	10,0
<b>IV</b>	6 – БАП – 3,0 мл; ИМК – 0,2 мл; энерген – 0,6 г	60	33,3	0	30	33,3
<b>V</b>	6 – БАП – 2,5 мл; ГК – 1,0 мл; ТДЗ – 4,0 мл; триптофан – 1000 мг	60	63,3	0	52	63,3
<b>VI</b>	6 – БАП – 2,0; НУК – 0,2; ГК – 1,5 мл; мезоинозит – 100 мг	60	58,3	0	42	58,3
	<b>Контроль</b> МС без гормонов	60	1,7	0	1	1,7
	<b>НСР 05</b>		3,2		5,3	3,2

Установлено, что морфогенные каллусы, инициированные от базальной части микропобегов чая и субкультивируемые на среде 6 – БАП – 2,5 мл + ГК – 1,0 мл + ТДЗ – 4,0 мл + триптофан – 1000 мг (V вариант) отличились высокими показателями индукции геммогенеза – 63,3 %. Кроме этого, на этом варианте среды получено сравнительно больше

регенерантов из морфогенного каллуса (52 шт.). Следует отметить, что на всех вариантах опыта основная индукция геммогенеза (от 1,7 до 63,3 %) приходилась на экспоненциальную фазу (первые 20 дней культивирования каллуса). В другой серии проведенных опытов было установлено действие экзогенных регуляторов роста различного генезиса на морфологические и ростовые показатели каллусной культуры чая *in vitro*. На всех вариантах питательной среды, уже на втором месяце культивирования, наблюдался переход каллусов в стационарную фазу (деградации) роста. Происходило это вследствие истощения питательной среды и окисления ее фенольными соединениями, что способствовало некрозу тканей. Кроме этого наблюдалась динамика в сторону изменения окраски и структуры каллуса – от зеленого цвета и средней плотности, на начальном этапе культивирования каллуса, до черного некротизированного и плотного, на конечном этапе. Исключение составил V вариант среды, на котором каллус, даже на 60-й день культивирования, не только сохранил свой морфогенный потенциал, но продолжал синтезировать хлорофилл, не отягощая при этом среду продуктами вторичного метаболизма (рис. 3; табл. 2).



Рисунок 3. Геммогенез в культуре растений чая *in vitro* (на питательной среде МС+6–БАП–2,5 мл+ГК–1,0 мл+ТДЗ–4,0 мл+триптофан–1000 мг)

Таблица 2 – Влияние экзогенных регуляторов роста на морфологические и ростовые показатели каллусных культур чая в культуре *in vitro*

Варианты питательных сред на основе базовой МС	Количество морфогенного каллуса, шт.	Окраска и структура каллуса			Масса каллуса, г		Относительный прирост массы каллуса ΔW, %
		на 10 –й день	на 30-й день	на 60-й день	начальная W <sub>0</sub>	конечная на 60 день W <sub>t</sub>	
<b>I</b> 6 – БАП– 2,0 2,4 Д – 1,0 аденин – 0,5 ТДЗ – 1,5 мл	60	зелено-вато-белый	белый	белый, рыхлый	0,286	0, 468	63,6
	зеленый средней плотности						
<b>II</b> 6 – БАП –2,5 НУК – 0,5 ИУК – 0,5 мл; мезоинозит – 100 мг; AgNO <sub>3</sub> –100 мг	60	зеленый	зелено-коричневый	темно-коричневый, с очагами некроза, средней плотности	0,300	0,586	95,3
	зеленый средней плотности						
<b>III</b> 6 – БАП –1,0 НУК– 0,25 мл; триптофан – 250 мг	60	зелено-коричневый	темно-коричневый	черный, некротизированный, плотный	0,295	0,494	67,4
	зеленый средней плотности						
<b>IV</b> 6 – БАП – 3,0 ИМК – 0,2 мл; энерген – 0,6 г	60	темно-зеленый	зелено-коричневый	темно-коричневый с некрозами плотный	0, 291	0,587	101,7
	зеленый средней плотности						
<b>V</b> 6 – БАП – 2,5 ГК – 1,0 ТДЗ – 4,0 мл; триптофан–1000 мг	60	зеленый	ярко-зеленый	ярко-зеленый, средней плотности	0,320	0,687	114,7
	зеленый средней плотности						
<b>VI</b> 6 – БАП – 2,0 НУК – 0,2 ГК – 1,5 мл; мезоинозит – 100 мг	60	зеленый	темно-зеленый	коричневый, средней плотности	0,316	0,670	112,0
	зеленый средней плотности						
<b>Контроль</b> МС – без гормонов	60	зелено-коричневый	темно-коричневый	черный, некротизированный, плотный	0,296	0, 380	28,3
	зеленый средней плотности						
<b>НСР 05</b>						0,152	25,2

Следует отметить, что на всех вариантах опыта отмечался прирост каллусной массы (от 63,6 до 114,7 %), в то время как на контроле этот показатель составил всего – 28,3 %, где в питательной среде присутствовала только минеральная основа МС.

Таким образом, в результате проведенных исследований разработан оптимизированный протокол культуральной среды для получения соматических клонов в культуре *in vitro*. Морфогенные каллусы культивируемые на среде МС, с добавлением: 6 – БАП – 2,5 мл + ГК – 1,0 мл + ТДЗ – 4,0 мл + триптофан – 1000 мг, отличились высокими показателями индукции геммогенеза – 63,3 %. Установлено, что лучшими экзогенными регуляторами роста для культивирования каллуса, при которых в течение длительного времени сохранялся морфогенный потенциал (60-й день) и прирост каллусной массы являются: 6 – БАП – 2,5 мл + ГК – 1,0 мл + ТДЗ – 4,0 мл + триптофан – 1000 мг.

### Список литературы

1. Гвасалия М.В. Интродуцированные формы чая и перспективы их возделывания в условиях Краснодарского края: Проблемы субтропического сельского хозяйства и перерабатывающей промышленности: матер. межд. науч. конф. // Субтропические культуры. 2010. № 1-4 (261-264). С. 42-45.
2. Гвасалия М.В. Микроразмножение и депонирование ценных генотипов чая (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) в культуре *in vitro* // Плодоводство и ягодоводство России. 2016. Т. 47. С. 87-93.
3. Гвасалия М.В. Биотехнологические приемы в селекции чая (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования: мат. XII междун. конф., 6-10 июня 2016, Ялта. Москва, изд-во РУДН, 2016. С. 308-311.
4. Гвасалия М.В. Клональное микроразмножение растений чая в культуре *in vitro* // Вестник Российской сельскохозяйственной науки. 2015. № 5. с. 36-37.
5. Долгих Ю.И., Шамина З.Б. Современные представления о причинах и механизмах соматической изменчивости // Молекулярные механизмы генетических процессов. М.: Наука, 1991. С.123-127.
6. Долгих Ю. И. Соматическая изменчивость растений и возможности ее практического использования: автореф. док. дис. Москва. 2005. 45 с.
7. Тимофеева О.А., Румянцева Н.И. Культура клеток и тканей растений. Учеб. пособ. Казань, 2012. С. 3-11.
8. Гвасалия М. В. Спонтанные и индуцированные сорта и формы чая (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) во влажных субтропиках России и Абхазии, перспективы их размножения и сохранения в культуре *in vitro*: дис. к.б.н. Краснодар, 2015. 159 с.
9. Larkin P.J., Scowcroft W.R. Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement // Theor. and Appl. Genet. 1981. 60. № 4. P. 197-214.
10. Кунах В.А. О возможности приложения закона гомологических рядов наследственной изменчивости Н.И. Вавилова к клеточным популяциям *in vitro* / Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений: сбор. статей межд. науч. конфер. Минск, 2014. С. 152-154.



11. Сорокина И.К., Старичкова Н.И. и др. Основы биотехнологии растений. Культура растительных клеток и тканей. Учебное пособие. Саратов, 2002. С. 20-23.
12. Тимофеева И.В. Биотехнология растений. Опорный конспект лекций. Павлодар, 2009. С. 6.
13. Вечканов Е. М., Сорокина И. А. Основы клеточной инженерии. Учебное пособие. Ростов-на-Дону, 2012. 136 с.
14. Barwale U.B., Widholm J.M. Somaclonal variation in plants regenerated from cultures of soybean // *Plant Cell Rep.* 1987. 6. № 5. P. 36-368.
15. Morrison R., Whitaker R., Evans D. Somaclonal variation: its genetic basis and prospects for crop improvement // *Opportunities Phytochem. Plant Biotechnol.* 1988. P.1-18.
16. Осипова Е.С. Вариабельность ДНК-маркеров (RAPD, ISSR) при соматоклональной изменчивости у кукурузы: автореф. дис. к.б.н. Москва, 2003.
17. Лебедев В.Г., Азарова А.Б. и др. Проявление соматоклональной изменчивости у микроразмноженных и трансгенных растений // *Известия ТСХА.* 2012. Вып. 1. С. 135-163.
18. Murashige T., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* 1962. № 4. P. 473-479.
19. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полишук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наукова Думка, 1980. 487 с.
20. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. Учеб. пособие. М.: ФБК. Пресс, 1999. С.14-23.
21. Авксентьева О.А., Петренко В.А. Биотехнология высших растений: культура *in vitro*. Учебно-метод. пособие. Харьков, 2011. С. 29-30.
22. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. Москва. Агропромиздат, 1985. С. 223-239.

## References

1. Gvasaliya M.V. Introdicirovannie formi chaya i perspektivi ih vozdelivaniya v usloviyah Krasnodarskogo kraya. Problemi subtropicheskogo selskogo hozyaistva i pererabativayuschei promishlennosti: mater. mejd. nauch. konf. // *Subtropicheskie kulturi.* 2010. № 1-4. (261-264). S. 42-45.
2. Gvasaliya M.V. Mikrorazmnojenie i deponirovanie cennih genotipov chaya (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze), v kulture *in vitro* // *Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii.* 2016. T. 47. S. 87-93.
3. Gvasaliya M.V. Biotehnologicheskie priemi v selekcii chaya (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) // *Novie i netradicionnie rasteniya i perspektivi ih ispolzovaniya: mat. XII mejdun. konf. 6-10 iyunya 2016.* Yalta. Moskva: izd-vo RUDN. 2016. S. 308-311.
4. Gvasaliya M.V. Klonalnoe mikrorazmnojenie rastenii chaya v kulture *in vitro* // *Vestnik Rossiiskoi selskohozyaistvennoi nauki.* 2015. № 5. S. 36-37.
5. Dolgih Yu.I., Shamina Z.B. Sovremennie predstavleniya o prichinah i mehanizmah somaklonalnoi izmenchivosti // *Molekulyarnie mehanizmi geneticheskikh processov.* М.: Nauka, 1991. S.123-127.
6. Dolgih Yu. I. Somaklonalnaya izmenchivost rastenii i vozmozhnosti ee prakticheskogo ispolzovaniya: avtoref. dok. dis. Moskva. 2005. 45 s.
7. Timofeeva O.A., Rumyanceva N.I. Kultura kletok i tkanei rastenii. Ucheb. posob. Kazan, 2012. S. 3-11.
8. Gvasaliya M. V. Spontannie i inducirovannie sorta i formi chaya (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) vo vlnajnih subtropikah Rossii i Abhazii, perspektivi ih razmnojeniya i sohraneniya v kulture *in vitro*. dis. k.b.n. Krasnodar, 2015. 159 s.

9. Larkin P.J., Scowcroft W.R. Somaclonal variation a novel source of variability from cell cultures for plant improvement // *Theor. and Appl. Genet.* 1981. 60. № 4. P. 197-214.
10. Kunah V.A. O vozmozhnosti prilozheniya zakona gomologicheskikh ryadov nasledstvennoi izmenchivosti N.I. Vavilova k kletochnim populyaciyam in vitro / *Biotehnologicheskie priemi v sohranении bioraznoobraziya i selekcii rastenii. sbor. statei mejd. nauch. konfer. Minsk, 2014. S. 152-154.*
11. Sorokina I.K., Starichkova N.I. i dr. Osnovi biotehnologii rastenii. *Kultura rastitelnykh kletok i tkanei. Uchebnoe posobie. Saratov, 2002. S. 20-23.*
12. Timofeeva I.V. *Biotehnologiya rastenii. Opornii konspekt lektsii. Pavlodar, 2009. S. 6.*
13. Vechkanov E. M., Sorokina I. A. Osnovi kletochnoi injenerii. *Uchebnoe posobie. Rostov-na-Donu, 2012. 136 s.*
14. Barwale U.B., Widholm J.M. Somaclonal variation in plants regenerated from cultures of soybean // *Plant Cell Rep.* 1987. 6. № 5. P. 36-368.
15. Morrison R., Whitaker R., Evans D. Somaclonal variation\_ its genetic basis and prospects for crop improvement // *Opportunities Phytochem. Plant Biotechnol.* 1988. P.1-18.
16. Osipova E.S. Variabelnost DNK markerov RAPD, ISSR, pri somaklonalnoi izmenchivosti u kukuruzi: avtoref. dis. k.b.n. Moskva, 2003.
17. Lebedev V.G., Azarova A.B. i dr. Proyavlenie somaklonalnoi izmenchivosti u mikrorazmnojennih i transgennih rastenii // *Izvestiya TSHA. 2012. Vip. 1. S. 135-163.*
18. Murashige T., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* 1962. № 4. P. 473-479.
19. Kalinin F.L., Sarnackaya V.V., Polishuk V.E. *Metodi kulturi tkanei v fiziologii i biohimii rastenii. Kiev, Naukova Dumka, 1980. 487 s.*
20. Butenko R.G. *Biologiya kletok visshih rastenii in vitro i biotehnologii na ih osnove. Ucheb. posobie. M.: FBK. Press, 1999. S.14-23.*
21. Avksenteva O.A., Petrenko V.A. *Biotehnologiya visshih rastenii: kultura in vitro. Uchebno\_metod. posobie. Harkov, 2011. S. 29-30.*
22. Dospheov B.A. *Metodika polevogo opita. Moskva:Agropromizdat,1985. S. 223-239.*