

6-бөлім
БИОТЕХНОЛОГИЯ

Раздел 6
БИОТЕХНОЛОГИЯ

Section 6
BIOTECHNOLOGY

Мырзағалиева А.Б.,
Самарханов Т.Н.,
Акзамбек А.М., Оразов А.Е.,
Садуова А.Б.

Восточно-Казахстанский
государственный университет
имени С. Аманжолова,
Казахстан, г. Усть-Каменогорск

**Введение в культуру
in vitro *Paeonia hybrida* Pall.
и *P. anomala* L.**

Целью настоящей работы являлось изучение особенностей введения в культуру *in vitro* видов *Paeonia hybrida* Pall. и *Paeonia anomala* L., редких и исчезающих видов флоры Казахстана. *Paeonia hybrida* Pall. является эндемиком Алтая. Численность и ареалы данных видов сокращаются из-за сбора растений на букеты, выкапывания корней для использования в целях лечения. В связи с этим задачей исследования являлось введение в культуру *in vitro* *Paeonia hybrida* и *Paeonia anomala*, для дальнейшего микроклонального размножения и использования полученного материала для сохранения и восстановления численности популяций данных видов. В работе приводятся данные по местообитанию и локализации данных видов на территории Казахского Алтая. Нами была отработана и принята наиболее оптимальная схема стерилизации исходного материала для культивирования в условиях *in vitro*. В качестве исходного материала рассматриваются различные типы эксплантов на разных стадиях развития растения: семена, отдельные части семян с зародышами почки возобновления. В данной работе описываются оптимальные условия и состав питательной среды с добавлением регулирующих веществ для развития эксплантов в условиях *in vitro*.

Ключевые слова: культура тканей и органов растений, клональное микроразмножение, сохранение биоразнообразия, эндемичные виды.

Myrzagalievya A.B.,
Samarkhanov T.N.,
Akzambek A.M., Orazov A.E.,
Saduova A.B.

S. Amanzholov East Kazakhstan State
University, Kazakhstan, Almaty

Introduction into the culture *in vitro* *Paeonia hybrida* Pall. and *P. anomala* L.

The main point of this work was researching of introducing features in *in vitro* culture that rare and endangered species as *Paeonia hybrida* Pall. and *P. anomala* L. of flora in Kazakhstan. *Paeonia hybrida* Pall. is endemic to Altai. Number and habitats of these species are reduced because of the collection of plants for bouquets, digging roots for use in treatment. In this regard, the task of the study was the introduction of an *in vitro* culture of *Paeonia hybrida* and *Paeonia anomala*, for further micropropagation and the use of the material obtained for the preservation and restoration of the population of these species populations. The paper presents data on habitat and location of these species on the territory of Kazakhstan Altai. We have worked out and adopted the most optimal scheme of starting material sterilization for cultivation *in vitro*. Various types of explants were used as starting material: seeds, embryos and isolated ground buds. This paper describes the optimum conditions and the composition of the nutrient solution with the addition of agents for regulating the explants under conditions *in vitro*.

Key words: culture of tissues and organs of plants, clonal micropropagation, conservation of biodiversity, endemic species.

Мырзағалиева А.Б.,
Самарханов Т.Н.,
Акзамбек А.М., Оразов А.Е.,
Садуова А.Б.

С. Аманжолов атындағы
Шығыс-Қазақстан мемлекеттік
университеті, Қазақстан, Алматы қ.

***Paeonia hybrida* Pall. және
P. anomala L. өсімдіктерін
in vitro жағдайына енгізу**

Жұмыстың мақсаты Қазақстан флорасының сирек кездесетін және жойылып бара жатқан *Paeonia hybrida* Pall. мен *P. anomala* L. өсімдік түрлерін *in vitro* жағдайына енгізу ерекшеліктерін зерттеу болып табылады. *Paeonia hybrida* Pall. өсімдігі Алтайдың эндемик түрлеріне жатады. Емдік мақсатта тамырларын қазып алу және өсімдіктерден гүл шоғын дайындағандықтан аталған түрлердің саны мен мекен ететін ареалы күрт азайып бара жатыр. Осыған байланысты зерттеудің міндеті *Paeonia hybrida* және *Paeonia anomala* өсімдіктерін *in vitro* культурасына енгізу және алынған материалды болашақта микроклодын көбейтіп, аталған түрлер популяциялары санын сақтап, қайтадан қалпына келтіру болып табылады. Мақалада аталған түрлердің Қазақстан Алтайы аумағында кездесетін аудандары мен өсетін орындары көрсетілген. *In vitro* жағдайында культурада өсіру үшін бастапқы материалды залалсыздандырудың ең қолайлы нұсқасы анықталып, қолданылды. Бастапқы материал ретінде экспланттардың бірнеше түрлері, яғни тұқымдар, ұрығы бар тұқым бөлігі және жаңару бүршіктер қарастырылады. Берілген жұмыста экспланттарды *in vitro* жағдайында өсіру үшін оптималды жағдайлары мен реттегіш заттар қосылған қоректік ортаның құрамына сипаттама беріледі.

Түйін сөздер: өсімдіктер ұлпалары мен мүшелерінің культурасы, клондық микрокөбейту, биоалуандылықты сақтау, эндемик түрлер.

**ВВЕДЕНИЕ
В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*
PAEONIA HYBRIDA
PALL. И *P.ANOMALA* L.****Введение**

Проблема сохранения биоразнообразия растений в последние годы стала одной из приоритетных задач охраны природного наследия. Наряду с традиционными способами сохранения растений *ex situ* все большее значение приобретает использование для этих целей культуры изолированных тканей и органов. Привлечение методов биотехнологии, базирующихся на культивировании изолированных органов, тканей и клеток растений для решения проблем сохранения биологического разнообразия имеет преимущества перед традиционно используемыми подходами. Таким образом, учитывая сильное антропогенное воздействие на ресурсы и состояние *Paeonia hybrida* Pall. и *Paeonia anomala* L., разработка методов их сохранения и восстановления является особенно актуальной.

Paeonia hybrida Pall. (*Paeoniaceae* Rudolphi) – Пион гибридный. Эндемик юго-востока Западной Сибири и гор Восточного Казахстана. Встречается в горах Алтая, Тарбагатае, Сауре, на северном склоне Джунгарского Алатау, а также в прилегающей части Восточного мелкосопочника. Растет на открытых щебнистых и каменистых степных склонах, среди кустарников от предгорий до среднего пояса гор [1].

Paeonia anomala L. (*Paeoniaceae* Rudolphi) – Пион уклоняющийся. Редкий и исчезающий вид, занесен в Красную книгу животных и растений Республики Казахстан. Произрастает преимущественно в Казахстане, Средней Азии, Алтае, в лесной зоне Сибири от Урала до Лены и Байкала, очень редко – на севере европейской части России [1].

Численность и ареалы данных видов сокращаются из-за сбора растений на букеты, выкапывания корней для использования в целях лечения. В связи с этим задачей исследования являлось введение в культуру *in vitro* *Paeonia hybrida* и *Paeonia anomala*, для дальнейшего микроклонального размножения и использования полученного материала для сохранения и восстановления численности популяций данных видов.

Ранее исследованиями по определению особенностей развития изолированных почек сортов пиона травянистого в условиях *in vitro* занималась Г.А. Талалаева (1983, 1984) [2, 3]. Ею

была изучена реакция эксплантов на экзогенные регуляторы роста, а также на трофические и физические факторы культивирования, были получены микропобеги сортовых пионов, но отмечены трудности в укоренении.

В опытах японских исследователей с травянистым пионом (*Paeonialactiflora* Pall.) за 1 месяц культивирования удалось получить дополнительных 2-3 побега. У зародышей пиона критической фазой, в которой он становится относительно автономным, т.е. способным пройти дальнейший эмбриогенез и развиваться без материнского организма в нормальное растение, является ранняя сердечковидная фаза – фаза дифференциации семядолей [4].

Также было показано, что зародыши видов *Paeonia* на разных стадиях развития, а также все органы проростка (на среде, индуцирующей каллусообразование) способны образовывать каллус, в котором при определенных условиях начинается морфогенез [5, 6, 7, 9]. Известно, что на этапе пролиферации для получения достаточно большого количества генетически однородных растений-регенерантов определяющими факторами являются физиологическое состояние исходного экспланта и условия культивирования. Эти факторы оказывают наиболее значимое влияние на реализацию морфогенетического потенциала растений *in vitro* [8, 10]. Также важную роль в получении успешно пролиферирующей культуры *in vitro* играют гормоны цитокининового ряда, при этом значительное влияние на коэффициент размножения *in vitro* оказывают не только изменение концентрации гормона в питательной среде, но и замена одного препарата на другой – с большей или меньшей биологической активностью [11, 12]. Отмечается, что совместное использование ауксинов и цитокининов обеспечивает увеличение коэффициента размножения у видов *Paeonia hybrida* [13].

Таким образом, в результате проведенного анализа литературных источников, видно, что к настоящему времени накоплен большой объем знаний по вопросам изучения биологических особенностей и морфогенеза травянистых пионов, в частности *Paeonialactiflora* и *Paeonia officinalis*, а также многочисленных сортов декоративных пионов. Исследования в основном посвящены вопросам ускоренного прорастания семян и методам вегетативного размножения растений, относящихся к роду *Paeonia*. Имеются сведения о возможности размножения *in vitro* сортов и видов *Paeoniasuffruticosa* Andr., *Paeonialactiflora* Pall. [3, 14], *Paeonia officinalis* L. [2] почками,

P.anomala [15] с использованием в качестве эксплантов боковых почек. Описаны эмбриогенез и органоогенез в культуре зародышей *Paeoniaanomala* [6].

Сведений по введению в культуру *Paeoniahybrida*, являющимся эндемиком юго-востока Западной Сибири и гор Восточного Казахстана в доступных литературных источниках не выявлено.

Целью настоящей работы являлось изучение особенностей введения в культуру *in vitro* видов *Paeoniahybrida* Pall. и *Paeoniaanomala* L., редких и исчезающих видов флоры Казахстана.

Материалы и методы исследования

Объекты исследования – *Paeoniahybrida* Pall. и *Paeoniaanomala* L. Для введения в культуру *in vitro* использовались семена и почки возобновления *Paeoniahybrida* и *Paeoniaanomala*. Материалы для исследования *Paeoniahybrida* и *Paeoniaanomala* были собраны Мырзагалиевой А.Б. и Самархановым Т. Н. в 2015 году во время полевых экспедиционных выездов на хребты Южного Алтая и Калбинский хребет.

Растения *Paeonia hybrida* для исследований отобраны в Восточно-Казахстанской области, на северо-восточном склоне перевала Умуш Калбинского хребта с координатами (по данным GPS): N 49°16.260'; E 086°09.328', на высоте 1318 м над уровнем моря. Площадь распространения пиона гибридного составила около 10 га. В злаково-разнотравно-кустарниковом фитоценозе кусты пиона достигали высоты 35-40 см, по площади размещены диффузно в виде небольших групп (рисунок 1). Кусты пиона находились в хорошем жизненном состоянии.

Семена *Paeonia anomala* были собраны на кустарниковых и кустраниково-разнотравных фитоценозах, на разнотравно-злаковой ассоциации по левому берегу ручья Жабыкен ущелья Жабыкен хребта Сарымсақты Южного Алтая, на территории Катон-Карагайского государственного национального парка с координатами (по данным GPS): N 49°12.408'; E 086°11.384 на высотном пределе от 1000 до 1800 м над уровнем моря (рисунок 2).

На момент сбора материала пион находился на стадии созревания семян (рисунок 2). В таких фитоценозах кусты пиона достигают до 70-80 см высоты, по площади размещены диффузно в виде небольших групп. Общее проективное покрытие – 90%, а пиона уклоняющегося – 40-50%.



Рисунок 1 – *Paeonia hybrida* на злаково-разнотравно-кустарниковом фитоценозе Калбинского хребта, перевал Умуш



Рисунок 2 – Плодоносящий куст *Paeonia anomala* в ущелье Жабыкен хребта Сарымсақты

Приготовление и стерилизацию питательных сред для культивирования эксплантов-растений проводили согласно общепринятым методикам [7, 16]. Для постановки эксперимента в качестве питательной среды, была использована модифицированная среда по прописи Мурасиге-Скуга с добавлениями регуляторов роста такие как индолилуксусная кислота (ИУК), бензиламинопурин (БАП), кинетин и гибберелловой кислоты (таблица 4). В

качестве эксплантов были использованы: семена, отдельные части семян с зародышами и почки.

Одним из важных моментов на этапе введения в культуру является выбор концентрации и экспозиции используемого стерилизующего агента. Нами были разработаны и опробованы две схемы стерилизации семян *Paeonia hybrida* и *Paeonia anomala* и почек возобновления *Paeonia hybrida*.

Таблица 1 – Схемы стерилизации первичного материала

№	Схема стерилизации экспланта	Время экспозиции, мин	
		Для семян и отдельных частей семян с зародышами	Для почек возобновления
1	Проточная вода	30	120
	Мыльный раствор	20	40
	90% этанол	5	5 секунд
	5% гипохлорит натрия	20	10
	Дистиллированная вода (3 порции)	10	20
2	Мыльный раствор	20	10
	10 % раствор пероксида водорода	20	5
	90% этанол	5	5 секунд
	Дистиллированная вода (4 порции)	10	20

Семена были разделены на две группы. Для каждой группы были использованы разные схемы стерилизации. Семена первой группы были предварительно промыты проточной водой, следом мыльным раствором 20 мин, затем в асептических условиях ламинар-бокса обраба-

тывали последовательно 95 % этанолом 5 мин, 5% гипохлоритом натрия 20 мин и трижды ополаскивали стерильной дистиллированной водой. Семена второй группы были погружены в мыльный раствор 20 мин, затем в 10 % раствор пероксида водорода на 20 мин, затем в асепти-

ческих условиях ламинар-бокса обрабатывали 95% этанолом 5 минут и четырежды ополаскивали стерильной дистиллированной водой (таблица 1).

Почки возобновления брали с корневища и были разделены на две группы. Первая группа почек в течение 2-х часов промывали проточной водой. Вырезали скальпелем с частью корневища, промывали мыльным раствором в течение 40 мин., и дальнейшую обработку стерилизующими реагентами проводили в условиях ламинар-бокса: 95 % этанолом 5 сек, 5% гипохлоритом натрия в соотношении 1:5 с дистиллированной водой в течение 20 мин, с последующей трехкратной промывкой в стерильной дистиллированной воде.

Вторая группа в течение 10 минут были погружены в мыльный раствор, затем в 10 % раствор пероксида водорода 5 минут, затем 95% этанол 5 секунд и дистиллированная вода (4 порции) в течение 20 минут(таблица 1).

Семена *Paeoniahybrida* были собраны сразу после созревания и были обработаны стерилизующими веществами. После стерилизации семена без повреждения семенной кожуры были высажены на твердую питательную среду Мурасиге/Скуга с добавлением регуляторов роста в трех вариантах: 1) 1,5 мг/л БАП, 2) 0,1 мг/л 3) ИУК и 1 мг/л БАП, 1 мг/л ИУК и 40 г/л сахарозы.

Семена *Paeonia anomala* были собраны на стадии молочной спелости в июле 2016 года. Семена были освобождены от семенной кожуры, зародыши с частью эндосперма были вырезаны и посажены на питательную среду по прописи

среду Мурасиге/Скуга с добавлением регуляторов роста в трех вариантах: 1) 0,1 мг/л ИУК, 2) 1,5 мг/л БАП и 3) ИУК 1 мг/л, БАП 1 мг/л, кинетина 1 мг/л, гиббереловой кислоты 0,1 мг/л. Через 15 дней было отмечено прорастание зародыша. Чтобы избежать дальнейшего ингибирования развития вследствие поликонденсации, прорастающий зародыш был изолирован и пересажен на новую питательную среду с добавлением ИУК 1 мг/л, кинетина 1 мг/л, гиббереловой кислоты 0,1 мг/л (рисунок 2).

Помимо семян, нами в качестве эксплантов для введения в культуру *in vitro* были использованы и почки возобновления *Paeoniahybrida*. Экспланты почек *Paeoniahybrida* прошли стерилизацию по двум схемам. После стерилизации были высажены на питательные среды Мурасиге/Скуга с добавлением регуляторов роста в трех вариантах: 1) ИУК 2 мг/л, БАП 1 мг/л, 2) 1 мг/л БАП, 1 мг/л ИУК и 40 г/л сахарозы, 3) ИУК 0,1 мг/л.

Культивирование эксплантов проводили в культивационном помещении при температуре 23-25°C, 16-часовом фотопериоде, освещенности 3,5-4 тыс. люкс и относительной влажности 70-80%. Каждые пять дней отмечалось количество инфицированных эксплантов.

Результаты исследования и их обсуждение

При испытании схем стерилизации первичного материала на этапе ведения в культуру учитывалось число инфицированных эксплантов (таблица 2).

Таблица 2 – Эффективность применения схем стерилизации

Номера схем	Виды эксплантов	Количество высаженных экземпляров, шт	Процент заражения, %
1 схема	Семена	24	12,5
	Отдельные части семян с зародышами	26	15,4
	Почки	23	8,7
2 схема	Семена	24	50
	Отдельные части семян с зародышами	26	77,0
	Почки	23	74,0

Из данных таблицы 2 следует, что применение 1-ой схемы стерилизации оказалась более эффективным. Так, при применении 90%

этанола в сочетании с 5%-ым гипохлоритом натрия доля эксплантов без признаков инфекции составила: для семян – 87,5; для отдель-

ных частей семян с зародышами – 84,6; для почек – 91,3 %.

Также нами были изучены рост и развитие разных видов эксплантов в зависимости от состава питательной среды (табл. 3). За показатель

определения эффективности вида эксплантов *Paeoniaanomala* и *Paeoniahybrida* для введения в культуру *invitro* состава питательной среды были взяты доля жизнеспособных эксплантов и их размеры.

Таблица 3 – Жизнеспособность *Paeoniaanomala* и *Paeoniahybrida* в условиях *invitro* в зависимости от состава питательной среды Мурасиге/Скугаи вида экспланта

№	Виды эксплантов	Состав питательной среды	Жизнеспособность, %	Средняя длина регенеранта, мм
	Семена	МС + 1,5 мг/л БАП	4,0	1,2±0,1
		МС +0,1 мг/л ИУК	0	1,4±0,3
		МС +1 мг/л БАП, 1 мг/л ИУК и 40 г/л сахарозы	2,0	1,5±0,5
1. А	Отдельные части семян с зародышами	МС +0,1 мг/л ИУК	19,0	5,3±1,5
		МС +1,5 мг/л БАП	25,0	5,7±1,4
		МС +1 мг/л ИУК, 1 мг/л БАП, 1 мг/л кинетина, 0,1 мг/л ГА ₃	51,0	6,4±1,3
	Почки	МС +2 мг/л ИУК, 1 мг/л БАП	35,0	19,0±2,3
		½ МС +1 мг/л БАП, 1 мг/л ИУК, ГА ₃ 1 мг/л и 40 г/л сахарозы	65,0	51,1±3,3
		МС +0,1 мг/л ИУК	51,0	16,1±2,3

Исходя из данной таблицы, для введения в культуру *invitro* фрагментов семени с зародышем *Paeoniaanomala* и *Paeoniahybrida* оптимальной оказалась среда Мурасиге/Скуга с добавлением 1 мг/л ИУК, 1 мг/л БАП, 1 мг/л кинетина, 0,1 мг/л гиббереловой кислоты. Для почек возобновления данных видов растений на этапе введения в культуру *invitro* наиболее эффективна питательная среда половинного состава Мурасиге/Скуга с добавлением 1 мг/л БАП, 1 мг/л ИУК, ГА₃ 1 мг/л и 40 г/л сахарозы. Введение в культуру *invitro* целых семян оказалось не эффективным, так как прорастание отмечающееся через месяц культивирования в дальнейшем не получило развития.

Ранее отмечалось, что при длительном культивировании семян происходит поликонденсация в питательную среду веществ фенольной природы, которая приводит к ингибированию клеточных делений, снижению жизнеспособности и дальнейшей гибели зародыша в семени [4].

При культивировании эксплантов из подземных почек через неделю после посадки на питательную среду наблюдалось активная пролиферация с образованием настоящих листьев (рисунок 3).



Рисунок 3 – Развитие почек *Paeoniahybrida* на питательной среде 1/2МС с повышенным содержанием сахарозы

Выводы

Разработаны приемы введения в культуру и культивирования *invitro* семян и изолированных зародышей *Paeoniahybrida* и *Paeoniaanomala*.

Показана возможность размножения в культуре *P. hybrida* из эксплантов почек возобновления. На этапе микроразмножения для представителей оптимальными являются питательные среды, дополненные 1 мг/л БАП, 1 мг/л ИУК и 40 г/л сахарозы. Применение среды Мурасиге/Скуга с половинной концентрацией солей, комплексом регуляторов роста (БАП, ИУК, GA₃) и 40 г/л сахарозы, оказалось эффективно на этапе введения почек в культуру и на этапе микроразмножения.

При использовании в качестве эксплантов для введения в культуру семян *Paeonia hybrida* и *Paeonia anomala* эффективным оказалось выделение части семени с зародышем, чем использование целого семени без скарификации. Для данного вида экспланта эффективна среда Мурасиге-Скуга

с добавлением ИУК 1 мг/л, БАП 1 мг/л, кинетина 1 мг/л, гибберелловой кислоты 0,1 мг/л.

Разработанные приемы получения растений-регенерантов пиона гибридного флоры Восточного Казахстана методами биотехнологии будут использованы для сохранения генофонда в коллекциях *in vitro*; полученные растения путем клонального микроразмножения будут адаптированы к открытому грунту, исследования будут продолжаться с дальнейшей интродукцией и реинтродукцией в природные популяции.

Работа выполнена в рамках фундаментальных научных исследований по приоритетам развития науки на 2015-2017 годы на тему «Разработка биотехнологических способов сохранения эндемичных и лекарственных растений в условиях *in vitro*».

Литература

- 1 Шипчинский Н. В., Комаров В. Л. Род 507. Пион – *Paeonia* // Флора СССР. В 30 т. / Гл. ред. акад. В. Л. Комаров; Ред. тома Б. К. Шишкин. – М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1937. – Т. VII. – С. 24-35.
- 2 Талалаева Г.А., Поликарпова Ф.Я. Некоторые вопросы микроразмножения пиона травянистого // Тез. докл. Всесоюз. конф. «Культура клеток растений и биотехнология» – Кишинев, 1983. – С. 133 – 134.
- 3 Талалаева Г.А. Возможность размножения декоративных культур *in vitro* // Тез. докл. науч.-практ. конф. молодых ученых и специалистов Московской обл. – М., 1984. – С. 83-84.
- 4 Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений. – СПб.: Из-во Санкт-Петербургского университета, 2002. – 232 с. ISBN 5-288-02606-8
- 5 Батыгина Т.Б., Бутенко Р.Г. Морфогенетические потенции зародыша покрытосеменных растений (на примере представителей рода *Paeonia*, сем. *Paeoniaceae*) // Ботан. журн. – 1981. – Т. 66. – № 11. – С. 1531-1547.
- 6 Брюхин В.Б. Развитие зародыша пиона *in vivo* и *in vitro* / Автореф. дис. канд. биол. наук. – Санкт-Петербург. – 1993. – 21 с.
- 7 Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1991. – 272 с.
- 8 Бутенко Р.Г. Культура клеток растений и биотехнология. – М.: Наука, 1986. – 280 с. ISBN 5-10-001257-9
- 9 Васильева В.Е., Фрейберг Т.Е., Батыгина Т.Б. Развитие зародышей пиона в культуре *in vitro* // Тез. докл. VII Всес. симп. по эмбриологии растений. – Киев, 1978. – Ч.3. – С. 9 – 11.
- 10 Высоцкий В.А. Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного материала плодово-ягодных культур / Автореф. дисс. ... докт. с.-х. наук. – М. – 1998. – 44 с
- 11 Pierik R.M. *In vitro* culture of higher plants. Netherl.: Dordrecht., 1987. – 344 p.
- 12 Kytel., Kleyn J. Plants from test tubes. An introduction to micro propagation. ; Portland, Oregon: Timber Press., 1996. – 240 p. ISBN-13: 978-1604692068
- 13 Ветчинкина Е.М. Биологические особенности культивирования *in vitro* семян и зародышей редких видов растений / Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – М., 2010. – 40 с.
- 14 Stanys V., Mazeikiene I., Staniene G., Siksnianas T. Effect of phytohormones and stratification on morphogenesis of *Paeonia lactiflora* Pall, isolated embryos // *Biologia*. – 2007. – Vol. 18. – No. 1. – P. 27-30
- 15 Зарипова А.А. Разработка технологии клонального микроразмножения пиона уклоняющегося (*Paeonia anomala* L.) / Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Уфа, 2006. – 40 с.
- 16 Калинин В.Ф., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Технология микроразмножения растений. – М.: Наук. думка, 1992. 36-46 с. ISBN 5-12-002424-6

References

- 1 Shipchinskij NV, Komarov VL (1937) *Paeonia*. In Flora of the USSR, [Pion. Flora SSSR] Publishing House of the Academy of Sciences of the USSR, Moscow, Russia, pp. 24-35. (In Russian)
- 2 Talalaeva GA., Polikarpova FJ. (1983) Some questions micro propagation herbaceous peony, Proc. of All-Union Conf. «The culture of plant cells and biotechnology», Kishinev [Nekotorye voprosy mikhrorazmnozheniya pionatrayvanistogo, Tez. dokl. Vsesoyuz. konf. «Kul'turakletokrastenyibiotekhnologiya»]. Kishinev, USSR, pp. 133-134. (In Russian)
- 3 Talalaeva GA, (1984) Even possible *in vitro* propagation of ornamental crops, Proc. of scientific-practical conf. of young

scientists and specialists of the Moscow region [Vozmoznostrazmnozheniya dekorativnykh kultur in vitro, Tez. dokl. nauch.-prakt. konf. molodykh uchennykh i spetsialistov Moskovskoy obl. M], Moscow, Russia, pp. 83-84. (In Russian)

4 Batygina TB, Vasileva VE (2002) Plant breeding [Razmnozheniye rasteniy]. SPb.: Publishing House of St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia, pp. 232, (In Russian) ISBN 5-288-02606-8

5 Batygina TB (1981) Morphogenetic potency embryo of angiosperms (for example, members of the genus *Paeonia*, the family *Paeoniaceae*) [Morfogeneticheskiye potentsii zarodyshepokrityosemennykh rasteniy (naprimere predstaviteley roda *Paeonia*, sem. *Paeoniaceae*)] Botanical journal, 66(11):1531-1547 (In Russian)

6 Brjuhina VB (1993) Development peony embryo in vivo and in vitro [Razvitiye zarodyshepionain vivo i in vitro]. Abstract of PhD Tesis of biol. sciences, St. Petersburg, Russia, pp. 21. (In Russian)

7 Butenko RG, (1991) Culture of isolated tissue morphogenesis and plant physiology [Kul'tura izolirovannykh tkanyey fiziologii yamorfogeneza rasteniy]. The ministry of science, Moscow, Russia, pp. 272. (In Russian).

8 Butenko RG (1986) The culture of plant cells and biotechnology [Kul'tura kletok rasteniy i biotekhnologiya]. The ministry of science, Moscow, Russia, pp. 280 (In Russian) ISBN 5-10-001257-9

9 Vasileva VE, Frejberg TE, Batygina TB (1978) The development of the embryos of the pion in the culture in vitro, Tez. isno report of All-Union VII Symp. Plant Embryology, Kiev [Razvitiye zarodysheypionov v kul'ture in vitro, Tez. dokl. VII Vses. simp. po embriologii rasteniy, Kiev] 3:9-11. (in Russian)

10 Vysokij VA (1998) Biotechnological methods in the production system, improved planting material of fruit and berry crop s [Biotekhnologicheskiye metody v sistemeproduktsii i razvedeniya posadonogomateriala plodovoy-yagodnykh kul'tur]. Abstract of PhD Tesis of agricultural Sciences, Moscow, Russia, pp. 44 (in Russian)

11 Pierik RM (1987) In vitro culture of higher plants. Dordrecht, Netherl., pp. 344

12 Kytte L, Kleyn J (1996) Plants from test tubes. An introduction to micropropagation, Timber Press, Portland, Oregon, USA, pp. 240. ISBN-13: 978-1604692068

13 Vetchinkina EM (2010) Biological features of in vitro culture seeds and embryos of rare plant species [Biologicheskiye osobennosti kul'tivirovaniya in vitro semyan zarodyshepokrityosemennykh vidov rasteniy]. Abstract of PhD Tesis of biol. sciences, Moscow, Russia, pp. 40. (in Russian)

14 Stanys V, Mazeikiene I, Staniene G, Siksnianas T (2007) Effect of phytohormones and stratification on morphogenesis of *Paeonia lactiflora* Pall, isolated embryos, *Biologia* Vol. 18, No. 1, pp. 27-30

15 Zaripova AA (2006) The development of clonal micro propagation technology of peony evading (*Paeonia anomala* L.) [Zaripova A.A. Razrabotka tekhnologii klonal'nogo mikrorazmnozheniya pionov na klonnyyayushchegosya (*Paeonia anomala* L.)], Abstract of PhD Tesis of biol. sciences, Ufa, Russia, pp. 40. (in Russian)

16 Kalinin VF, Sarnackaja VV, Polishchuk VE (1992) Technology micro propagation plant propagation [Tekhnologiya mikroklonal'nogo razmnozheniya rasteniy], Dumka, Moscow, Russia, pp. 36-46. (in Russian) ISBN 5-12-002424-6