

**Муниципальное бюджетное учреждение дополнительного образования  
«Станция юных натуралистов»  
г. Алексеевка**

Белгородская область, г. Алексеевка

Объединение: экологический мониторинг

Номинация: Прикладная клеточная биология, биотехнология, генетика и селекция

**Разработка эффективного протокола микроклонального размножения  
сортов эустомы (*Eustoma grandiflorum*) для быстрого получения посадочного  
материала с сохранением ценных сортовых признаков**

**Автор:** КАРПЕНКО ИВАН,  
обучающийся объединения  
«Экологический мониторинг»  
МБУ ДО «СЮН»  
г. Алексеевка

**Руководитель:** Богданов Сергей  
Станиславович, педагог  
дополнительного образования  
МБУ ДО «СЮН»  
г. Алексеевка

**2025 год**

## Содержание

<b>Введение</b>	
<b>Глава 1. Обзор литературы</b>	<b>4</b>
1.1. История введения в культуру эустомы	4
1.2. Биологические особенности эустомы	4
1.3. Классификация сортов эустомы	5
1.4. Особенности размножения эустом	7
1.5. Понятие микрклонального размножения растений	7
1.6. Классификация питательных сред	9
1.7. Этапы микрклонального размножения	9
<b>Глава 2. Объект и методы исследования</b>	<b>10</b>
2.1. Объекты исследования	10
2.2. Стерилизации эксплантов сортов эустомы для культивирования в условиях <i>in vitro</i> .	11
2.3. Приготовление питательной среды Мурасиге – Скуга	11
2.4. Схемы экспериментов по микрклональному размножению сортов эустомы	12
2.5. Оборудование и приборы	13
<b>Глава 3. Результаты исследований</b>	<b>14</b>
3.1. Оптимизация процесса стерилизации эксплантов эустомы для снижения контаминации в процессе микрклонального размножения	14
3.2. Оптимизации индукции побегов (множественное побегообразование) сортов эустомы	16
3.3. Оптимизации элонгации (удлинения) побегов сортов эустомы	18
3.4. Оптимизации ризогенеза (укоренения) побегов сортов эустомы	19
3.5. Морфогенез побегов эустомы. Количественные результаты эксперимента	21
3.6. Экономическая оценка микрклонального размножения эустомы на стадии морфогенеза	22
3.7. Акклиматизации растений эустомы, полученных методом микрклонального размножения	23
<b>Выводы</b>	
<b>Литература</b>	
<b>Приложение</b>	



## Введение

Эустома (*Eustoma grandiflorum*) – является ценной декоративной культурой, которая востребована во флористике благодаря красоте и разнообразию окрасок бутонов, а также длительному сроку хранения после срезки. Традиционно эустому размножают семенами. Однако, этот способ имеет ряд существенных недостатков. Семенное размножение эустомой характеризуется длительным периодом от посева до цветения (150-200 дней), что ограничивает возможности быстрого получения посадочного материала. Кроме того, при семенном размножении не всегда сохраняются ценные сортовые признаки, что приводит к неоднородности потомства. Вегетативное размножение эустомы черенкованием ограничено, в следствие не высокой укореняемости растений [7, 27].

В связи с этим, актуальным вопросом является поиск и оптимизация альтернативных методов размножения эустомы, в частности микроклонального размножения (*in vitro*). Данный способ размножения обладает рядом преимуществ перед семенным размножением и классическим вегетативным (черенкованием): высокая скорость размножения, сохранение генетической идентичности, оздоровление материала, размножение трудно укореняемых форм [3, 16].

Несмотря на перспективность микроклонального размножения, существенной проблемой является отсутствие оптимизированного протокола для размножения эустомы в культуре тканей. Его разработка – это актуальной задачей, решение которой, позволит повысить эффективность микроклонирования и существенно снизить затраты на его реализацию.

**Цель исследования:** разработка эффективного протокола микроклонального размножения эустомы (*Eustoma grandiflorum*) для быстрого получения посадочного материала с сохранением ценных сортовых признаков.

**Для достижения поставленной цели в работе решали следующие задачи:**

1. установить оптимальное сочетание концентраций, стерилизующих веществ (этанол/ гипохлорит натрия, этанол/диацид), а также времени экспозиции, которое обеспечит максимальную выживаемость эксплантов эустомы;
2. изучить влияние различных концентраций цитокининов (БАП) и ауксинов (ИУК) на индукцию побегов эустомы *in vitro* .
3. определить оптимальные концентрации БАП (6-бензиламинопурин) и ГА3 (гиббереллиновая кислота) для достижения максимальной элонгации (удлинения) побегов эустомы, полученных *in vitro*.
4. оптимизировать процесс ризогенеза (укоренения) побегов эустомы *in vitro* с использованием различных концентраций ауксинов (ИМК) и добавок (активированный уголь).
5. рассчитать экономическую эффективность протокола микроклонального размножения эустомы на стадии морфогенеза.
6. разработать схему акклиматизации растений эустомы, полученных *in vitro*, к условиям *ex vitro*.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1. История введения в культуру эустомы

Эустома (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Sweet), часто именуемая лизиантусом или тexasским колокольчиком, занимает особое место в мировой флористике и декоративном растениеводстве [27]. Она принадлежит к семейству Горечавковые (*Gentianaceae*), которое знаменито своими лекарственными и декоративными растениями. Изначально эустома произрастала в диком виде в южных штатах США, Мексике и на Карибских островах [24]. Ее природная среда обитания – это луга и прерии с умеренно влажным климатом, где она приспособилась к условиям с высокой инсоляцией и перепадами температур.

История культивирования эустомы началась сравнительно недавно, в 1930-х годах, когда японские селекционеры обратили внимание на ее потенциал как декоративного растения [24]. Селекционная работа над эустомой была начата в Японии, где она встретила благоприятные условия для роста и развития. Японские селекционеры (Sakata Seed Corporation, Takii Seed) стали пионерами в создании первых культурных сортов, пригодных для выращивания в коммерческих целях [24]. Они использовали методы гибридизации и отбора для получения растений с улучшенными характеристиками: крупные цветки, окраска венчика, махровость и устойчивость к биотическим факторам среды.

Первые сорта эустомы, которые появились на рынке, были простыми, т. е. махровость отсутствовала. Однако, благодаря работе селекционеров, были созданы махровые сорта. Они обладали высокими декоративными качествами и привлекательностью [27]. Японские селекционеры разработали методы выращивания эустомы в теплицах, что позволило получать товарную продукцию круглый год.

В 1980-х годах эустома начала завоевывать популярность в Европе и Северной Америке [24]. Европейские и американские селекционеры продолжили работу по улучшению сортов эустомы. Создавая новые гибриды с различными характеристиками, они значительно расширили сортимент. В настоящее время эустома является одной из самых востребованных срезочных культур в мире, благодаря своей красоте, разнообразию окрасок и длительному сроку хранения после срезки [28].

### 1.2. Биологические особенности эустомы

Эустома – это травянистое растение, которое в культуре чаще всего выращивается как однолетник. В природе может быть двулетним [14]. Высота растения варьирует в зависимости от сорта и условий выращивания, обычно изменяется в пределах от 20 до 90 см. Стебель эустомы прямостоячий, ветвистый, что обеспечивает обилие цветков на одном растении. Листья супротивные, ланцетные или овальные, с характерным сизовато-зеленым оттенком, с восковым налетом [16]. Восковой налет защищает листья от избыточной потери влаги и солнечного излучения. Это является адаптацией к засушливым условиям (Рис.1).



Рис.1. Эустома крупноцветковая (*Eustoma grandiflorum*)

Цветки эустомы крупные, воронковидной формы, достигают в диаметре 5-8 см (Рис.1) [7]. Окраска цветков отличается разнообразием: белая, розовая, лиловая, фиолетовая, желтая, кремовая, зеленая, персиковая, двух- и трехцветная (Рис.2). Существуют как простые (немахровые), так и махровые сорта, которые отличаются количеством лепестков [30]. Махровые сорта обладают высокой декоративностью и ценятся за пышность и обилие лепестков (Рис.2).

Эустома – это растение длинного дня и требует значительное количество света [27]. Для нормального роста и развития ей необходимо не менее 12-14 часов солнечного света в день. В условиях недостаточного освещения растения вытягиваются, плохо цветут и становятся более восприимчивыми к болезням. Оптимальная температура для выращивания эустомы составляет 20 - 25°C в дневное время и 15-18°C ночью [16]. Резкие перепады температуры негативно сказываются на развитии растения и приводят к снижению качества цветков.

Эустома предпочитает хорошо дренированные, плодородные почвы с нейтральной или слабокислой реакцией (рН 6,5-7,0) [25]. Тяжелые глинистые почвы не подходят для выращивания эустомы, так как они плохо пропускают воду и тормозят процесс аэрации. Это может привести к загниванию корней. Растение чувствительно к переувлажнению и засухе, а также к засолению почвы [13]. Важно поддерживать оптимальный уровень влажности почвы и регулярно подкармливать растения комплексными минеральными удобрениями.

Корневая система эустомы развита слабо, поэтому она плохо переносит пересадку. При выращивании рассады необходимо использовать небольшие емкости и избегать повреждения корней при пересадке в открытый грунт или контейнеры [16].

### 1.3. Классификация сортов эустом

Классификация сортов эустом основана на нескольких признаках, таких как высота растения, форма цветка, сроки цветения, окраска цветка и назначение [24, 27].

#### По высоте растения выделяют:

*Высокорослые сорта* (70-90 см и выше) предназначены для срезки, используются в коммерческом цветоводстве для получения товарной продукции (Рис.2).



Рис.2. Сорта эустомы разной высоты и окраски бутона

*Среднерослые сорта* (40-60 см) подходят для выращивания в контейнерах, на клумбах и в ландшафтном дизайне (Рис.2).

*Низкорослые сорта* (20-30 см) используются для оформления бордюров, балконных ящиков и в качестве горшечных растений (Рис.2).

### **По форме цветка выделяют:**

*Простые (немахровые) сорта:* имеют один ряд лепестков, выглядят более естественно и элегантно (Рис.2).

*Махровые сорта:* имеют несколько рядов лепестков, обладают более пышным и декоративным видом (Рис.2).

*Супермахровые сорта:* имеют очень большое количество лепестков, образующих плотный шар (Рис.2).

### **По срокам цветения выделяют:**

*Ранние сорта:* зацветают через 100-120 дней после посева, подходят для выращивания в условиях короткого вегетационного периода.

*Средние сорта:* зацветают через 120-150 дней после посева, наиболее распространенная группа сортов.

*Поздние сорта:* зацветают через 150-180 дней после посева, требуют более длительного периода для развития.

В настоящее время различные интернет площадки предлагают для цветоводов-любителей широкий выбор сортов эустом, на разный вкус и бюджет. Ниже представлены наиболее популярные у цветоводов серии сортов с краткими характеристиками [24, 27, 28].

### **Высокорослые сорта для срезки:**

**Эхо.** Одна из самых популярных серий с крупными махровыми цветками различных окрасок (белая, розовая, лавандовая, желтая и др.). Высота 70-90 см. Отличается ранним и обильным цветением.

**Мариачи.** Серия с махровыми цветками пастельных тонов (белый, розовый, кремовый, лавандовый). Высота 80-100 см. Характеризуется прочными стеблями и длительным сроком хранения после срезки.

**Арена.** Серия с крупными махровыми цветками ярких окрасок (красный, фиолетовый, желтый, оранжевый). Высота 70-80 см. Отличается устойчивостью к болезням и вредителям.

**Фламенко.** Серия с полумахровыми цветками различных окрасок (белый, розовый, сиреневый, желтый). Высота 70-80 см. Характеризуется быстрым ростом и ранним цветением.

**Розанна.** Серия с махровыми цветками нежных пастельных тонов (белый, розовый, кремовый). Высота 70-80 см. Отличается высокой устойчивостью к неблагоприятным условиям выращивания.

**Преимущество.** Серия с махровыми цветками ярких и насыщенных окрасок (красный, фиолетовый, оранжевый, желтый). Высота 70-80 см. Обладает хорошей транспортабельностью и длительным сроком хранения.

**Знаменитость.** Серия с супермахровыми цветками, напоминающими розы. Различные окраски цветка. Высота 70-90 см.

### **Контейнерные сорта:**

**Розита.** Серия с махровыми цветками компактной формы (белый, розовый, лавандовый). Высота 40-50 см. Идеально подходит для выращивания в горшках и контейнерах.

**Адонис Синий Пикоти.** Необычные двухцветные цветки. Высота 45 см.

**Сапфир.** Серия с простыми и полумахровыми цветками, компактная и устойчивая к болезням. Высота 30-40 см.

**Золушка.** Серия с махровыми цветками нежных окрасок (белый, розовый, кремовый). Высота 30-40 см. Отличается компактным размером и обильным цветением.

**Дублуни.** Махровые цветы, длительное цветение, высота 40-50 см.

#### **Низкорослые сорта для бордюров и балконов:**

**Маленький Колокольчик.** Серия с простыми цветками колокольчиковой формы (белый, розовый, лавандовый). Высота 20-30 см. Подходит для оформления бордюров, балконных ящиков и в качестве горшечного растения.

**Русалка.** Серия с махровыми цветками нежных окрасок (белый, розовый, кремовый). Высота 20-30 см. Отличается компактным размером и обильным цветением.

**Навсегда.** Серия с махровыми цветками различных окрасок (белый, розовый, лавандовый). Высота 25-35 см. Характеризуется хорошей устойчивостью к неблагоприятным условиям выращивания.

**Мерцание.** Простой цветок с заостренными лепестками, компактной формы (20-30 см).

#### **1.4. Особенности размножения эустом**

Эустому размножают преимущественно семенами, поскольку вегетативные методы (черенкование, деление куста) имеют не высокий коэффициент размножения [16]. Семена у эустомы очень мелкие, пылевидные, поэтому посев требует особой аккуратности [19]. Чаще всего используются дражированные семена, которые облегчают посев и обеспечивают более равномерное распределение семян в посевном ящике или кассете. Семенное размножение эустом характеризуется длительным периодом от посева до цветения (150-200 дней), что ограничивает возможности быстрого получения посадочного материала.

Размножение эустомы (*Eustoma grandiflorum*) черенкованием – менее распространенный метод, чем выращивание из семян. Это связано с тем, что эустома довольно трудно укореняется черенками, и процент укоренившихся растений не высок. Особенно если не соблюдаются условия культивирования [14, 30].

Перспективным направлением вегетативного размножения эустомы может служить микроклональное размножение. Речь о нем пойдет в следующих разделах.

#### **1.5. Понятие микроклонального размножения растений**

Микроклональное размножение или *in vitro* размножение, представляет собой метод вегетативного размножения растений, основанный на культивировании в асептических условиях изолированных клеток, тканей или органов растений в стерильных условиях на искусственных питательных средах [3]. Этот метод позволяет получать генетически идентичные копии (клоны) исходного растения-донора, сохраняя его ценные хозяйственные признаки [11]. Сущность микроклонального размножения заключается в активации потенциала растительных клеток к дедифференцировке (образованию каллуса) и последующей редифференцировке (органогенезу или эмбриогенезу) под воздействием внесенных регуляторов роста и оптимальных условий культивирования [3].

В процессе микроклонального размножения используются различные экспланты – изолированные фрагменты растений. Это могут быть верхушечные и пазушные почки [5], фрагменты листьев [3], стеблей [3], корней [29], а также отдельные клетки и протопласты [8]. В зависимости от типа экспланта и используемого метода, процесс регенерации растений может происходить через стадию образования каллуса – недифференцированной массы клеток, или напрямую, без образования каллуса (прямой органогенез или эмбриогенез) [3, 11]. Полученные регенераты проходят стадию укоренения и последующей адаптации (акклиматизации) к условиям *ex vitro*, что позволяет перенести их в теплицу или открытый грунт [3, 8, 15].

Микроклональное размножение обладает рядом значительных преимуществ по сравнению с классическими методами вегетативного размножения, такими как черенкование, отводки и прививки [21, 22].

Эти преимущества представлены в сравнительной таблице 1.

**Таблица 1**

**Сравнение микроклонального размножения с классическими методами вегетативного размножения**

Характеристика	Микроклональное размножение	Классическое вегетативное размножение (черенкование, отводки, прививки)
<b>Скорость размножения</b>	Очень высокая: позволяет получить большое количество растений за короткий промежуток времени, не зависящий от сезонности	Низкая или средняя: требует больше времени для получения достаточного количества посадочного материала, часто ограничена сезонными факторами
<b>Коэффициент размножения</b>	Высокий: один эксплант может дать десятки и сотни растений	Низкий: количество растений ограничено количеством доступных черенков, отводков и привоев
<b>Оздоровление материала</b>	Возможность получения здорового, свободного от вирусов и других патогенов посадочного материала путем культивирования меристем	Ограничено: здоровье исходного растения влияет на здоровье получаемого посадочного материала, требуется тщательный отбор здоровых растений-доноров
<b>Размножение сложных видов</b>	Позволяет размножать трудно укореняемые виды растений, а также растения с низкой способностью к вегетативному размножению	Ограничено: некоторые трудно укореняемые виды практически не поддаются классическим методам вегетативного размножения
<b>Независимость от сезона</b>	Независимо от сезонных факторов: позволяет производить посадочный материал круглогодично в контролируемых условиях	Зависимо от сезона: черенкование, отводки и прививки часто ограничены определенными периодами года
<b>Генетическая стабильность</b>	Как правило, высокая: микроклональное размножение обеспечивает получение генетически идентичных копий исходного растения, хотя существует риск соматической изменчивости	Высокая: классические методы вегетативного размножения также обеспечивают сохранение генетической идентичности, риск генетических изменений минимален
<b>Масштабируемость</b>	Большая: позволяет быстро наращивать производство посадочного материала в промышленных масштабах	Ограничена: масштабирование производства требует значительных затрат времени и ресурсов

## 1.6. Классификация питательных сред, применяемых в культуре *in vitro*

Питательные среды являются основным фактором, от которых зависит успех микрклонального размножения (Таб. 2) [3]. Существует множество различных питательных сред, разработанных для культивирования *in vitro* различных видов растений.

Таблица 2

### Сравнительная характеристика основных питательных сред

Среда	Основные компоненты	Преимущества	Недостатки	Применение
MS	Макро- и микроэлементы, витамины, аминокислоты, сахара	Широкий спектр применения, стимулирует рост и развитие, высокая доступность	Высокое содержание солей, может быть токсичной для некоторых видов	Большинство видов растений, особенно подходит для размножения побегов, каллусных культур
B5	Макро- и микроэлементы, витамины, аминокислоты, сахара	Подходит для культур клеток, менее токсична, стимулирует образование биомассы	Менее эффективна для некоторых видов	Культуры клеток, суспензионные культуры, получение вторичных метаболитов, может использоваться для укоренения трудных для укоренения видов
White	Макро- и микроэлементы, витамины, сахара	Простая в приготовлении, подходит для корневых культур, низкая стоимость	Ограниченный состав, не подходит для большинства видов	Культуры корневых органов, некоторые виды растений, часто используется для изучения минерального питания в условиях <i>in vitro</i>
NN	Макро- и микроэлементы, витамины, аминокислоты, сахара	Подходит для культур пыльников и гаплоидных растений, низкое содержание аммония	Требует точного подбора гормонов, менее универсальна чем MS	Культуры пыльников, гаплоидные растения, получение генетически однородного материала, используется в генетических исследованиях

## 1.7. Этапы микрклонального размножения

Микрклональное размножение включает несколько последовательных этапов, каждый из которых играет важную роль в обеспечении успешного получения посадочного материала [3].

1. **Выбор и подготовка экспланта.** Выбор здорового материнского растения, стерилизация экспланта для предотвращения контаминации культуры микроорганизмами [66].

2. **Введение в культуру *in vitro*.** Помещение стерильного экспланта на питательную среду в стерильных условиях [3, 29].

3. **Мультипликация (размножение).** Стимулирование образования побегов или эмбрионов путем культивирования экспланта на питательной среде, содержащей определенные регуляторы роста [3, 29].

4. **Укоренение.** Индукция образования корней путем культивирования побегов на питательной среде, содержащей ауксины [12].

5. **Акклиматизация.** Постепенная адаптация *in vitro* растений к условиям *ex vitro* путем постепенного снижения влажности и повышения освещенности [26].

## Глава 2. Объект и методы исследования

### 2.1. Объект исследования

В качестве объекта для исследования мы выбрали 5 сортов эустомы (*Eustoma grandiflorum*) (Рис.3). Растения-доноры приобретались в КФХ «Цветкоff» на территории Воронежской области.



Рис. 3. Внешний вид исследуемых сортов  
Характеристика сортов представлена в таблице 3 [24, 27].

Таблица 3

### Характеристика исследуемых сортов

Название сорта	Генетическое происхождение	Серия	Описание сорта	Страна оригинатор / Автор сорта
<b>Арена F1 Красный</b>	<i>Eustoma grandiflorum</i> (Takii Seed)	Арена	Крупные, густомахровые цветки насыщенного, чистого красного цвета, диаметром 6-8 см. Высота растения 70-80 см.	Япония / Takii Seed Corporation
<b>Арена III F1 Монт Бланк</b>	<i>Eustoma grandiflorum</i> (Takii Seed)	Арена	Классический белый сорт с густомахровыми цветками, создающими эффект «полного» цветка. Диаметр цветка 6-8 см. Устойчив к болезням и подходит для срезки.	Япония / Takii Seed Corporation
<b>Флорида Пинк</b>	<i>Eustoma grandiflorum</i> (Sakata Seed)	Флорида	Полумахровые цветки светло-розового оттенка, диаметром 6-8 см. Высота растения 60-80 см. Подходит для выращивания в горшках и контейнерах.	Япония / Sakata Seed Corporation
<b>Флорида Блю</b>	<i>Eustoma grandiflorum</i> (Sakata Seed)	Флорида	Цветки лавандово-голубого цвета, полумахровые, среднего размера. Высота 60-80 см. Подходит для выращивания в горшках и балконных ящиках.	Япония / Sakata Seed Corporation
<b>Мариачи Кармин</b>	<i>Eustoma grandiflorum</i> (Sakata Seed)	Мариачи	Яркие, карминно-красные, густомахровые цветки с волнистыми лепестками, диаметром до 8 см. Высота растения 70-90 см.	Япония / Sakata Seed Corporation

Исследование морфогенеза эустомы проводилось в течение 2024 – 2025гг. в условиях стационара. И включало в себя 4 основных этапа исследования: стерилизация эксплантов, индукции побегов, элонгации побегов, ризогенез побегов. План исследования представлен в таблице 4.

## План исследования микрклонального размножения эустом

№ П/П	Название исследования	Период	Ответственные
1	Оптимизация процесса стерилизации эксплантов эустомы для снижения контаминации в процессе микрклонального размножения	2024 год	Пасечная А. Рыбалкина П. Карпенко И. Рыжих А.
2	Оптимизация индукции побегов (множественное побегообразование) сортов эустомы	2025 год	Пасечная А. Рыбалкина П. Карпенко И. Рыжих А.
3	Оптимизация элонгации (удлинения) побегов сортов эустомы	2025 год	Рыбалкина П. Карпенко И.
4	Оптимизация ризогенеза (укоренения) побегов сортов эустомы	2025 год	Рыбалкина П. Карпенко И.

## 2.2. Стерилизации эксплантов сортов эустомы для культивирования в условиях *in vitro*.

В качестве первичных эксплантов мы использовали фрагменты стеблей с боковыми почками. Вторичными эксплантами служили побеги, полученные на этапе мультипликации (размножения). Эти побеги использовались для проведения экспериментов по оптимизации элонгации и ризогенеза.

Для успешного микрклонального размножения эустомы ключевым этапом является получение асептического растительного материала. Экспланты эустомы, полученные от здоровых растений-доноров, выдерживали в растворе этанола (70%) в течение 3-х минут, а затем стерилизовали.



Рис.4. Заготовка и стерилизация эксплантов

В качестве стерилизующих агентов использовали раствор гипохлорита натрия (ГН) и диацета в различных концентрациях и экспозициях (Рис. 4). Изучали влияние различных концентраций и времени экспозиции стерилизующих агентов на выживаемость и контаминацию эксплантов (Рис. 4).

Схемы опытов по оптимизации стерилизации эксплантов эустомы представлены в приложении 1.

## 2.3. Приготовление питательной среды Мурасиге – Скуга

В работе использовались компоненты питательной среды Мурасиге – Скуга (MS), гормоны (GA3, БАП, ИМК, ИУК), витамины и пр. (фирмы «БиолоТ»). Приготовление питательной среды и ее стерилизацию, а также стерилизацию инструментов и оборудования проводили по общепринятым методикам [3,5, 29].

Приготовление питательной среды проводили по рекомендациям таких авторов как Р. Г. Бутенко, Н. В. Катаевой, А. В. Степанова, Т. А. Егоровой, и др.. Приготовление включало следующие этапы:

### 1. Приготовление маточного раствора

В работе мы использовали готовые маточные растворы фирмы «БиолоТ» (Рис.5).

**Добавление компонентов** на 1 литр дистиллированной воды добавляли маточный раствор солей MS в необходимой концентрации, а также 30 г сахарозы (в качестве источника углеводов), витамины группы В (В1, В3, В6), необходимые регуляторы роста (цитокинины – БАП, ауксины – ИУК) в концентрациях, указанных в схемах экспериментов. Для железа использовали хелатный комплекс (Рис.5, 1).

2. **Регулировка pH** до 5,8 осуществлялась с помощью 1 N NaOH или 1 N HCl перед добавлением агара (Рис.5, 2).

3. **Добавление агара** 8 г/л для придания среде твердой структуры.

4. **Автоклавирование.**

Питательную среду разливали в флaskи (чашки Петри, контейнеры, колбы и пр.). Автоклавиrowание флaskов осуществляли при температуре 121°C в течение 20 минут (Рис.5, 4). Стерильную среду выдерживали в течение 3-х дней на стеллажах, чтобы проверить ее на контаминацию. При отсутствии в флaskах контаминации их помещали в ламинарный бокс.

**2.4. Схемы экспериментов по микроклональному размножению сортов эустомы**

Схемы экспериментов по индукции, элонгации (удлинения) и ризогенезу (укоренения) побегов сортов эустомы представлены приложении 2.

Экспланты культивировали при температуре  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , фотопериод - 16 часов света / 8 часов темноты, интенсивность света 2000-3000 люкс в контролируемых условиях (поддержание влажности и температуры. Работу с эксплантами проводили в асептических условиях ламинар бокса (Рис.6).



**Рис.5. Приготовлении среды MS, стерилизация среды и инструментов**



**Рис. 6. Работа с эксплантами в асептических условиях ламинар бокса**

## 2.5. Оборудование и приборы

Для выполнения экспериментальной части исследования мы использовали различное оборудование. Марка оборудования (прибора) и его назначения представлены в таблице 5.

Таблица 5

### Оборудования и приборы

№ п/п	Наименование оборудования / прибора	Марка и модель	Этап эксперимента
1	Магнитная мешалка с подогревом	ПЭ - 6110	Приготовление питательной среды
2	Сухожаровой шкаф	ГП – 10 СПУ	Стерилизация металлических инструментов
3	Автоклав	VK - 18	Стерилизация питательной среды, стеклянного и пластикового оборудования
4	Весы	CAS XE-300, точность -0,001 г	Взвешивание компонентов питательной среды
5	Металлические стеллажи	NL (NeatLab)	Культивирование эксплантов и микрорастений в контролируемых условиях
6	Фитоламы	FitoLed 45W Red	Обеспечение фотопериода при культивировании эксплантов и микрорастений
7	Датчики влажности и температуры проводные с контроллером	TM9002	Культивирование эксплантов и микрорастений. Поддержание контролируемых условий
8	Ламинарный бокс (самодельный)	HEPA фильтр H14 900x600 Толщина фильтра – 150 мм	Работа с эксплантами в асептических условиях

Полученные в ходе исследований данные анализировали с помощью программного пакета Excel 2007. В процессе анализа находили среднее значение, ошибку среднего.

## Глава 3. Результаты исследований

### 3.1. Оптимизация процесса стерилизации эксплантов эустомы для снижения контаминации в процессе микроклонального размножения

Одним из важнейших этапов при введении растений в культуру *in vitro* является поверхностная стерилизация эксплантов для предотвращения контаминации грибами и бактериями. Эффективность стерилизации определяется балансом между уничтожением поверхностной микрофлоры и сохранением жизнеспособности тканей растения. На рисунке 7, 8 представлены данные отражающие влияние различных концентраций гипохлорита натрия (ГН) и диацита, а также времени экспозиции на выживаемость эксплантов эустомы (приложение 3,4).

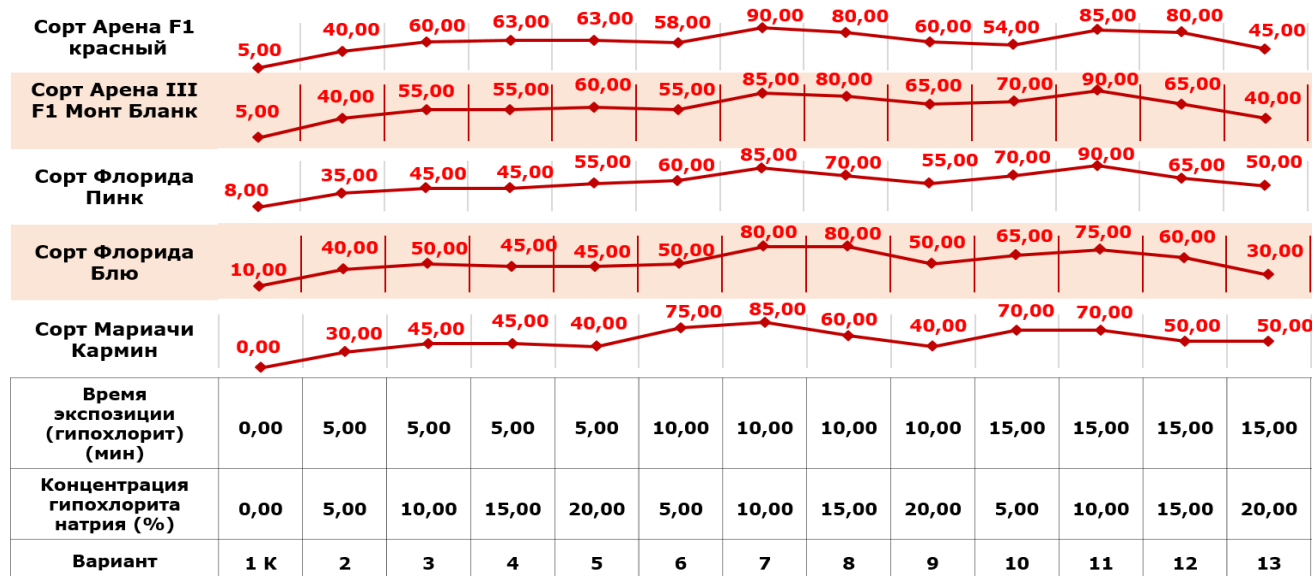


Рис. 7. Влияние концентрации гипохлорита натрия и времени экспозиции на выживаемость эксплантов сортов эустомы, %

Как видно из представленных на рисунке 7 данных, обработка 10% раствором гипохлорита натрия в течение 10 минут (вариант 7 для каждого сорта) в среднем обеспечивает хорошие результаты по всем рассматриваемым сортам эустомы, демонстрируя выживаемость эксплантов на уровне 80-90% в зависимости от сорта. Использование гипохлорита натрия в концентрации 5%, напротив, часто оказывалось недостаточно эффективным, приводя к снижению выживаемости до 50-60% для многих сортов (вариант 2 для каждого сорта) (Рис. 7). Более высокие концентрации гипохлорита натрия (15% и 20%) также не приводили к улучшению результатов, а, наоборот, снижали выживаемость из-за повреждения тканей эксплантов (варианты 4, 5, 8, 9, 12, 13 для каждого сорта) (Рис. 7). Таким образом, гипохлорит натрия демонстрирует достаточно узкий диапазон эффективных концентраций, выход за пределы которого приводит либо к недостаточному обеззараживанию, либо к повреждению тканей (приложение 3).

Для некоторых сортов, например, Арена F1 Красный, оптимальной является комбинация 10% гипохлорита натрия и 10 минут экспозиции, обеспечивающая 90% выживаемость (вариант 7) (Рис. 7). Однако для сорта Флорида Пинк вариант с 10% ГН и 15 минутной экспозицией (вариант 11) также показывает высокую выживаемость и низкий уровень контаминации (Рис. 7) (приложение 3).

Несколько иная картина наблюдалась при использовании диацида в качестве стерилизующего агента. Результаты, представленные на рисунке 8 (приложение 4).



Рис. 8. Влияние концентрации диацида и времени экспозиции на выживаемость эксплантов сортов зустомы, %

Влияние концентрации диацида и времени экспозиции на выживаемость эксплантов сортов зустомы, демонстрируют, что диацид является перспективной альтернативой гипохлориту натрия. Одним из ключевых преимуществ диацида является его более мягкое воздействие на растительные ткани, что позволяет достичь сопоставимой, а в ряде случаев и более высокой выживаемости эксплантов при меньшей экспозиции и концентрации действующего вещества.

Так, для сорта Арена F1 Красный, обработка 0,2% раствором диацида в течение 10 минут обеспечивает 80% выживаемости (вариант 6) (Рис. 8), что статистически сопоставимо с результатами, полученными при обработке 10% гипохлоритом натрия в течение того же времени (90% выживаемости, вариант 7, (Рис. 8)). При этом использование диацида позволяет снизить риск повреждения тканей эксплантов, которое может наблюдаться при применении более высоких концентраций гипохлорита натрия. Обработка 0,1% раствором диацида с экспозицией 5 мин. приводила к снижению выживаемости до 65-70% (вариант 2). Однако, даже при снижении концентрации диацида, выживаемость остается на приемлемом уровне, что говорит о более широком диапазоне его эффективных концентраций по сравнению с гипохлоритом натрия (приложение 3,4).

Аналогичные тенденции наблюдаются для сорта Арена III F1 Монт Бланк, где обработка 0,2% диацидом в течение 10 минут приводит к 85% выживаемости (вариант 6) (Рис. 8), что превышает показатели, полученные при использовании 10% гипохлорита натрия, где выживаемость составила 80% (вариант 7, Рис. 7).

Сорта Мариачи Кармин и Флорида Блю демонстрируют устойчивость к обработке как гипохлоритом натрия, так и диацидом. Однако концентрации диацида, обеспечивающие сравнимую или более высокую выживаемость, остаются значительно ниже, что снижает риск повреждения эксплантов. В частности, для сорта Мариачи Кармин обработка 0,1% диацидом в течение 10 минут обеспечила 65% выживаемости (вариант 5) (Рис. 8), в то время как для достижения аналогичного результата при использовании гипохлорита натрия, как правило, требуется более

высокая концентрация (10%, вариант 7, Рис. 7). Это подтверждает, что диацид обладает более широким диапазоном эффективных концентраций, позволяющим добиться приемлемой выживаемости даже при относительно низких концентрациях (приложение 3,4).

### 3.2. Оптимизации индукции побегов (множественное побегообразование) сортов эустомы

Первым и критически важным этапом микроклонального размножения эустомы является индукция побегов. Эффективность этого этапа определяет возможность получения достаточного количества посадочного материала для дальнейших этапов размножения. В данном исследовании были изучены различные концентрации БАП (6-бензиламинопурина) и ИУК (индолил-3-уксусной кислоты) для индукции побегов у 5 сортов эустомы. На основании данных (приложение 5), можно выделить оптимальные концентрации БАП и ИУК для каждого сорта эустомы (Рис.9.)

Анализ данных показывает, что комбинация 1,00 мг/л БАП и 0,10 мг/л ИУК в среднем обеспечивает хорошие результаты по всем рассматриваемым сортам эустомы (Рис. 9.) (Приложение 5).

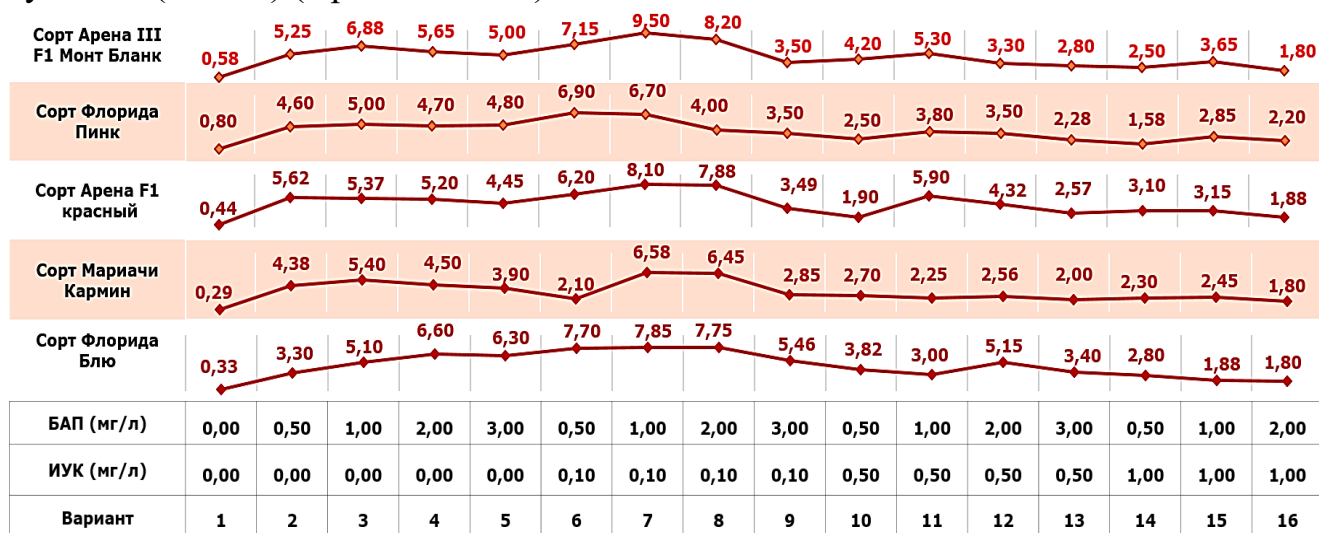


Рис. 9. Количество побегов на эксплант в зависимости от концентрации БАП и ИУК, шт.

Для некоторых сортов, например, Арена F1 Красный, Арена III F1 Монт Бланк, лучшая комбинация составляет 1,00 мг/л БАП + 0,10 мг/л ИУК (вариант 7), обеспечивая высокие показатели количества побегов на эксплант ( $8,10 \pm 1,00$  (вариант 7) для сорта Арена F1 Красный (Рис. 9.) Для других сортов, например, Флорида Пинк, и Флорида Блю также подходит состав 0,50 мг/л БАП + 0,10 мг/л ИУК (вариант 6), хотя максимальное количество побегов наблюдается даже при других концентрациях, но процент эксплантов с побегами значительно ниже, чем у других сортов. Сорт Мариачи Кармин также демонстрирует хорошие результаты по этому показателю при концентрации 1,00 мг/л БАП + 0,10 мг/л ИУК (вариант 7) ( $6,58 \pm 0,45$  шт.), однако нуждается в дополнительных исследованиях для выявления оптимальной концентрации (Рис.9) (Приложение 5).

Различные концентрации гормонов влияют на длину побегов (Рис.10). Комбинация 1,00 мг/л БАП + 0,10 мг/л ИУК (вариант 7) обеспечивает в среднем достаточно высокую длину побегов. Для сорта Арена F1 Красный, например, длина побегов составляет  $7,77 \pm 1,10$  мм (вариант 7).

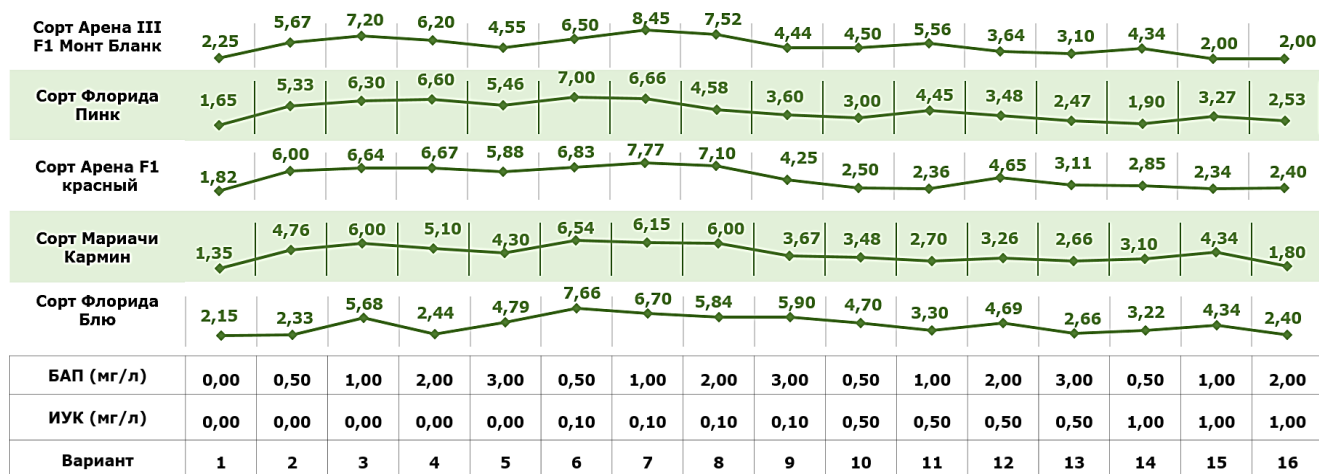


Рис. 10. Длина побегов в зависимости от концентрации БАП и ИУК, мм

На рисунке 11 отображен процент эксплантов с побегами в зависимости от концентрации гормонов. Анализ данных показывает, что комбинация 1,00 мг/л БАП + 0,10 мг/л ИУК (вариант 7) демонстрирует стабильно высокие показатели процента эксплантов с побегами, в частности, достигая 84% для сорта Арена F1 Красный (вариант 7).

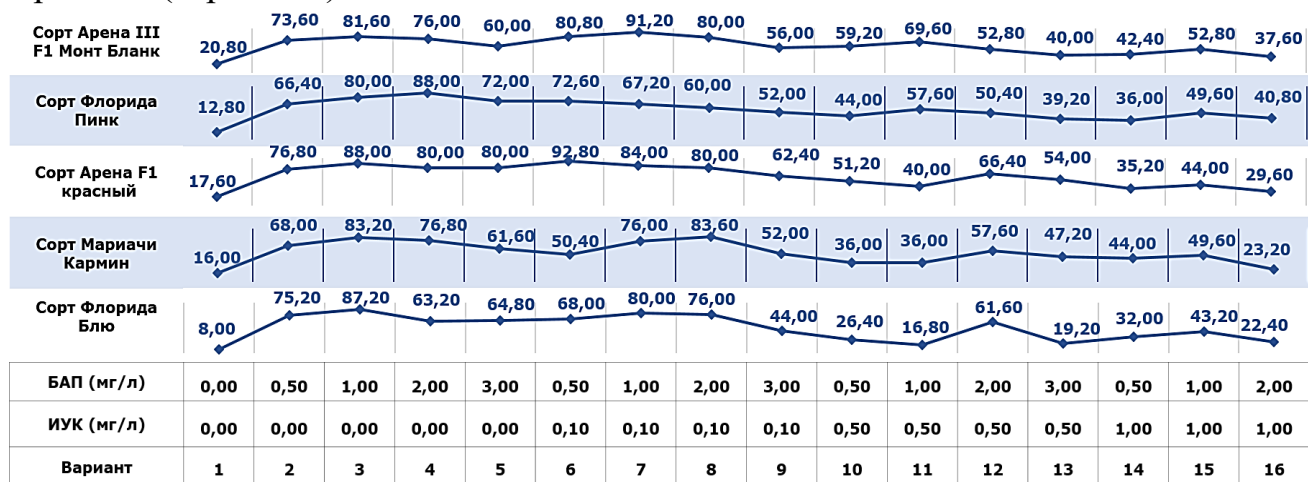


Рис.11. Процент эксплантов с побегами в зависимости от концентрации БАП и ИУК, %

Таким образом, рассмотрение всех трех параметров (количества побегов на эксплант, процента эксплантов с побегами и длины побегов) в совокупности подтверждает, что комбинация 1,00 мг/л БАП + 0,10 мг/л ИУК (вариант 7) обеспечивает наиболее эффективную стимуляцию побегообразования в среднем по всем исследованным сортам (Рис.12) (Приложение 5).

Добавление небольшой концентрации ИУК (0,10 мг/л) в большинстве случаев способствовало повышению процента эксплантов с побегами, улучшая общую эффективность размножения, как видно из сравнения вариантов 2-5 с вариантами 6-9 для каждого сорта. Более высокие концентрации БАП (2,00 или 3,00

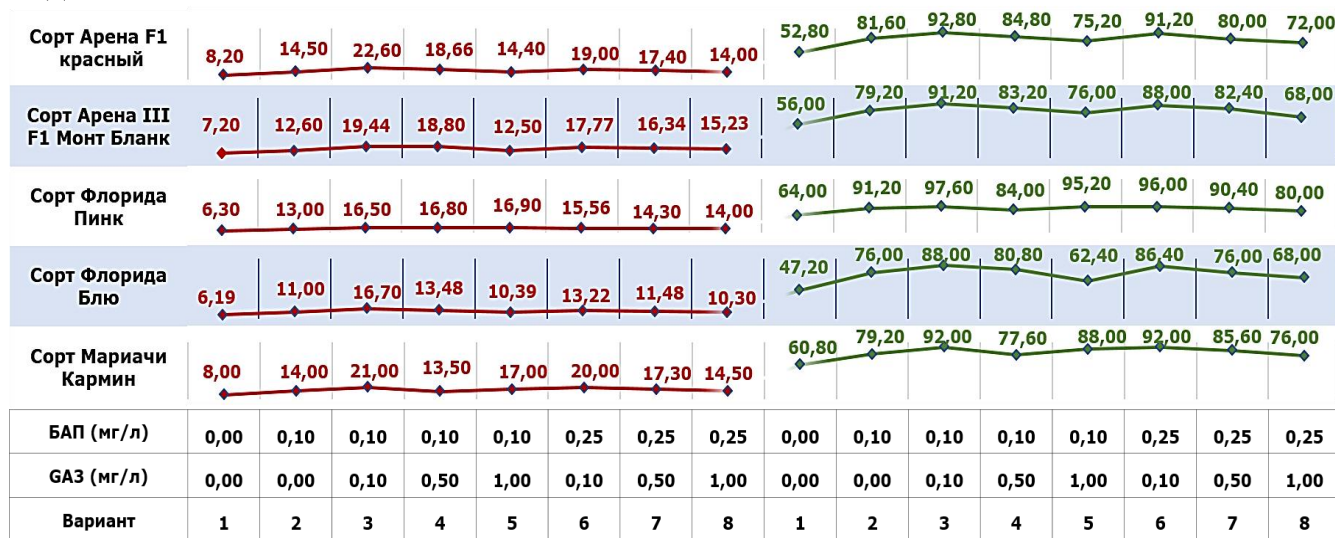
мг/л) приводили к снижению потенциала индукции, особенно в присутствии высоких концентраций ИУК (0,50 и 1,00 мг/л) (Рис.9,10,11) (Приложение 5).

### 3.3. Оптимизации элонгации (удлинения) побегов сортов эустомы

Следующий этап микроклонального размножения эустомы включал в себя исследование процесса элонгации сформированных побегов. Данный процесс имеет важное значение для дальнейшего успешного укоренения и адаптации растений к условиям *ex vitro*. В данном исследовании была изучена эффективность различных концентраций БАП (6-бензиламинопурина) и GA3 (гибберелловой кислоты) на процесс элонгации побегов пяти различных сортов эустомы *in vitro* (приложение 6). Данные представленные ниже (Рис.13) демонстрируют влияние различных гормональных комбинаций на среднюю длину побегов, процент побегов с элонгацией и их внешний вид.



Рис.12. Этап индукции побегов у сорта Флорида Пинк



■ - Средняя длина побега (мм)

■ - % побегов с элонгацией

Рис. 13. Стимуляции элонгации побегов различных сортов эустомы при различных концентрациях БАП и GA3

Анализ данных, представленных на рисунке 13, показывает, что комбинация 0,10 мг/л БАП и 0,50 мг/л GA3 (вариант 4) в среднем обеспечивает хорошие результаты по стимуляции элонгации побегов для всех рассматриваемых сортов эустомы. При этом обеспечивается хороший внешний вид побегам (без аномалий). Для сортов эустомы Арена F1 Красный и Арена III F1 Монт Бланк данная комбинация обеспечивает достаточно высокую среднюю длину побега (18,66 – 18,80 мм) (вариант 4) с хорошим процентом элонгации (более 80%) (вариант 4) и здоровым внешним видом. У сорта Мариачи Кармин наблюдалась несколько меньшая длина побегов

(13,50 мм) (вариант 4) (Рис.13). Сорт Флорида Блю продемонстрировал наименьший (13,48мм) потенциал элонгации (вариант 4). Внешний вид побегов также оценивается как «здоровые, без визуальных отклонений» (Рис.13) (Приложение 6).

Другие концентрации могут давать большую длину, но при этом нарушается нормальный внешний вид (например, побеги становятся слишком тонкими или толстыми). Высокие концентрации ГАЗ и БАП не привели к дальнейшему улучшению показателей, а иногда и к ухудшению внешнего вида. В некоторых случаях наблюдалось снижение длины побега (Рис.13) (Приложение 6).

### 3.4. Оптимизации ризогенеза (укоренения) побегов сортов эустомы

Заключительным этапом микроклонального размножения эустомы является ризогенез – процесс образования корней у микропобегов. Успешное укоренение *in vitro* напрямую влияет на дальнейшую приживаемость и адаптацию растений к условиям *ex vitro*. В данном исследовании изучено влияние различных концентраций ИМК (индолил-3-масляной кислоты) и активированного угля на процесс ризогенеза побегов пяти различных сортов эустомы (Приложение 7). ИМК является ауксином, который стимулирует образование корней. Активированный уголь адсорбирует ингибиторы ризогенеза (фенольные соединения и другие метаболиты), которые могут выделяться эксплантами в среду, тем самым улучшая процесс укоренения.

Наиболее эффективный ризогенез побегов эустомы *in vitro* обеспечивается при использовании среды, содержащей ИМК в концентрации 1.0 мг/л и активированный уголь в концентрации 1 г/л (вариант 7). Данные результаты подтверждаются анализом основных показателей ризогенеза: процент укоренившихся побегов (Рис. 14), среднее число корней на побег (Рис. 15) и длина самого длинного корня (Рис. 16) (Приложение 7).

Сорт Арена F1 Красный, демонстрирует высокие результаты при использовании указанной комбинации (вариант 7) (Рис.14).

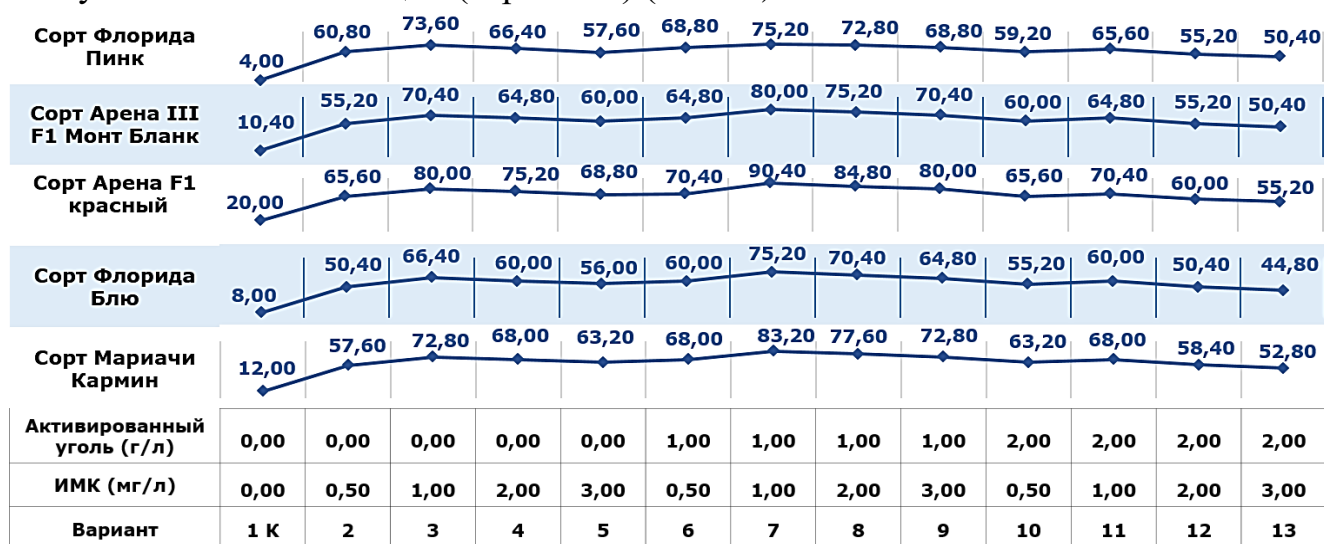


Рис.14. Влияние концентраций ИМК и активированного угля на процент укоренения побегов, %

Процент укоренения достигает 90,40%, что значительно выше, чем в других вариантах (Рис.12). Этот высокий процент укоренения сопровождается и развитием нормальной корневой системы (Рис.13) (Приложение 7).

Переходя к анализу показателей корнеобразования, следует отметить, что у сорта Арена F1 Красный (вариант 7) формируется в среднем 8,71 шт. корней на побег, что существенно превосходит другие варианты. Для сравнения, при отсутствии активированного угля (вариант 1) формируется лишь 1,5 шт. корня (Рис.15).

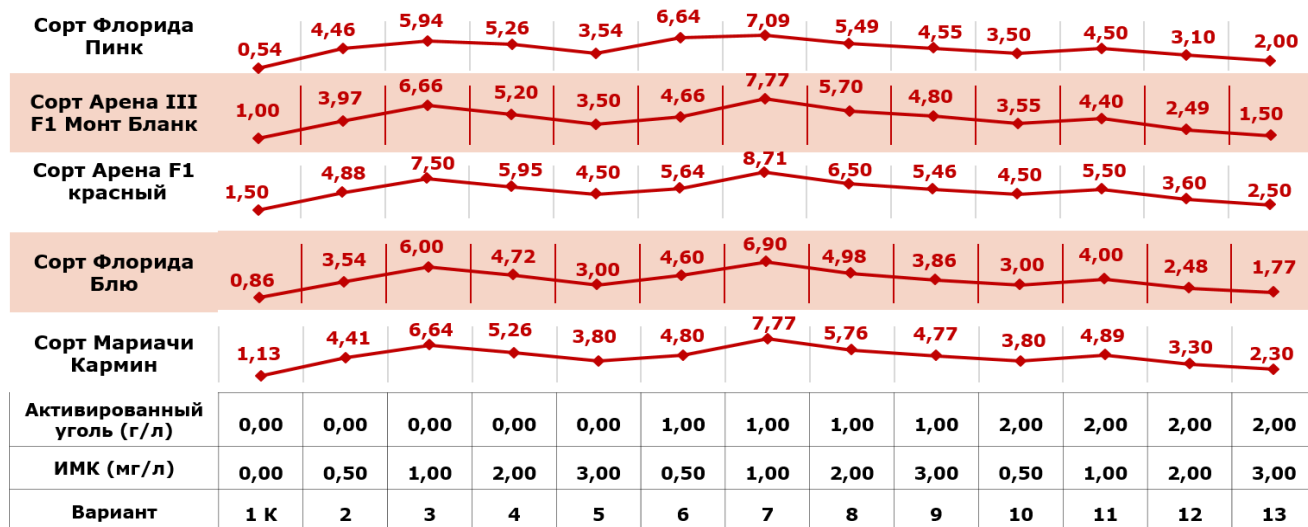


Рис. 13. Влияние концентраций ИМК и активированного угля на среднее число корней на побег, шт.

Концентрация ИМК 1,00 мг/л и активированного угля 1 г/л также положительно сказывается на длине корневой системы. У сорта Арена F1 Красный (вариант 7) длина самого длинного корня достигает 15,00 мм, что является максимальным показателем среди всех исследованных вариантов. Кроме того, состояние корней оценивается как отличное (Рис.16) (Приложение 7).



Рис. 16. Влияние концентраций ИМК и активированного угля на длину самого длинного корня, мм.

Сорта Арена III F1 Монт Бланк и Мариачи Кармин также демонстрируют хорошие результаты при оптимальной концентрации ИМК и активированного угля (вариант 7). Процент укоренения составляет 80,00% и 83,20% соответственно (Рис.14), среднее число корней - 7,77 шт. и 7,77, шт. (Рис.15), а длина самого длинного корня – 13,80 мм и 13,5 мм (Рис.16). В то же время, сорта Флорида Пинк и

Флорида Блю показывают меньшие результаты по всем показателям, что отражает сортовые особенности ризогенеза (Рис.16) (Приложение 7).

Варианты с высокой концентрацией ИМК (2,00 мг/л - вариант 8 и 3,00 мг/л - вариант 9) в сочетании с активированным углем показали неплохие результаты, однако среднее число корней и длина корней в этих случаях часто ниже, чем при использовании 1,00 мг/л ИМК (Рис.14, 15, 16) (Приложение 7). Например, для сорта Арена F1 Красный при концентрации ИМК 2,00 мг/л (вариант 8) среднее число корней составляет 6,50 шт. (Рис.15), а длина самого длинного корня – 12,00 мм (Рис.16), что ниже, чем при концентрации 1,00 мг/л (вариант 7). Схожая тенденция наблюдается и для других сортов.

Использование более низкой концентрации ИМК (0,50 мг/л, вариант 2) ожидается приводит к снижению показателей укоренения, уменьшению числа корней и снижению их длины. Например, для сорта Флорида Блю процент укоренения снижается с 66,40% (при 1,00 мг/л ИМК, вариант 7) до 50,40% (при 0,50 мг/л ИМК, вариант 2) (Рис.12). Кроме того, среднее число корней уменьшается с 6,00 шт. до 3,54 шт. (Рис.13), а длина самого длинного корня - с 9,91 мм до 7,00 мм (Рис.14). Несмотря на снижение количественных показателей, состояние корневой системы оценивается как «нормальное» или «отличное», что указывает на влияние других факторов на морфологию корней.

Интересно отметить, что отсутствие активированного угля (вариант 1) приводит к значительному ухудшению ризогенеза, что, вероятно, связано с накоплением в среде ингибиторов укоренения. В то же время, более высокая концентрация активированного угля (2,00 г/л, варианты 10-13) не дает существенных преимуществ в большинстве случаев, а иногда даже снижает показатели укоренения и развития корневой системы.

Возможно, это связано с избыточным поглощением активированным углем необходимых для ризогенеза веществ из питательной среды.

По окончании 3-х этапов морфогенеза побегов эустомы нам удалось получить микро-растения с развитой корневой системой для всех представленных сортов (Рис. 17).

### **3.5. Морфогенез побегов эустомы. Количественные результаты эксперимента**

В ходе исследования наблюдались расхождения между запланированным и фактическим количеством эксплантов на флашку, полученным в наших опытах (Таб. 5). Заданные схемы экспериментов (Приложение 2) отражают идеальные условия.



**Рис.17. Микро-растения сорта Арена F1 Красный в конце морфогенеза**

Таблица 5

**Количественные показатели, полученные в ходе исследования микроклонального размножения эустомы**

№ п/п	Этап исследования	Кол-во вариантов, шт.	Кол-во повторностей, шт.	Кол-во фласков, шт.	Кол-во эксплантов в пассаже, шт.	Кол-во перенесенных эксплантов/побегов, шт.
1	Индукция побегов	16	5	5	5	2000
2	Элонгация побегов	8	5	5	6	1200
3	Ризогенез побегов	13	5	5	3	975

**Индукция:** Использовано 2000 эксплантов для обеспечения статистической значимости (Таб. 5).

**Элонгация:** Количество эксплантов уменьшилось до 1200 (перенос только здоровых побегов с этапа индукции). Процент переноса – около 60% (Таб. 5).

**Ризогенез:** Количество растений уменьшилось до 975 (отбор растений, успешно прошедших элонгацию и достигших требуемого размера, исключение аномалий). Отобрано около 80% растений с этапа элонгации (около 960 шт.) (Таб. 5).

### 3.6. Экономическая оценка микроклонального размножения эустомы на стадии морфогенеза

Оценка экономической эффективности является ключевым этапом при изготовлении любого продукта. Детальный анализ затрат позволяет определить, насколько прибыльным и рентабельным будет микроклонирование эустомы. В нашей работе экономическую эффективность размножения эустомы мы оценивали с учетом затрат на материалы (Приложение 8), оплату труда, электроэнергию (Приложение 8) и прочие расходы. В расчетах мы использовали некоторые дополнительные данные для экономического анализа:

Почасовая оплата труда лаборанта в биотехнологической лаборатории: 300 руб./час (среднее значение).

Длительность этапов микроклонирования: индукция - 3 недели, элонгация - 3 недели, ризогенез - 3 недели (средние значения).

Фотопериод: 16 часов света/8 часов темноты в сутки.

Стоимость электроэнергии (Белгородская область, двухтарифный учет, с учетом повышения на 6%): дневная зона (с 7:00 до 23:00): 5.00 руб/кВтч, ночная зона (с 23:00 до 7:00): 2.50 руб/кВтч.

Основные результаты оценки экономической эффективности микроклонального размножения эустомы на стадии морфогенеза в таблице 6.

Таблица 6

**Анализ экономической эффективности микроклонирования эустомы на стадии морфогенеза**

Показатель	Значение (руб.)
Себестоимость одного экспланта (из таблицы 4)	96,17
Потенциальная цена реализации 1 экспланта	250
Прибыль с одного экспланта	153,83
Рентабельность	159,96

Исходя из представленных в таблице 6 данных, мы видим, что себестоимость одного регенерата эустомы составляет приблизительно 96,17 рубля (Приложение 7). Это с учетом всех затрат на материалы, труд и электроэнергию, необходимые для производства одного растения (Приложение 8). Рентабельность производства на данном этапе исследования составляет 159,96 %, что является высоким и привлекательным показателем.

### 3.7. Акклиматизации растений эустомы, полученных методом микроклонального размножения

Акклиматизации растений предполагает поэтапный адаптации растений к новым условиям. Это позволит минимизировать стресс и обеспечить оптимальную среду для развития на каждом этапе. Этапы акклиматизации представлены в таблице 17 [6, 8].

Таблица 17

#### Основные этапы акклиматизации эустомы к условиям *ex vitro*

№	Название этапа	Сроки	Условия
1	Подготовка растений	1-2 дня	Отбор здоровых, укорененных растений с побегами 1,5-2 см. Аккуратное промывание корней в стерильной воде для удаления остатков агара [2].
2	Первый этап (высокая влажность)	7-14 дней	Посадка в стерильный субстрат (торф: перлит: вермикулит - 2:1:1) [3]. Влажность 90-95% (мини-теплички, пленка, увлажнители). Рассеянное освещение (1000-1500 люкс), 14-16 часов светового дня. Температура 22-25°C днем, 18-20°C ночью. Регулярное опрыскивание водой или 1/4 раствором удобрений [4].
3	Второй этап (постепенное снижение влажности)	7-14 дней	Постепенное снижение влажности (проветривание). Увеличение интенсивности освещения (до 2000-3000 люкс). Умеренный полив по подсыханию субстрата. Подкормка 1/2 раствором комплексных удобрений с микроэлементами [6].
4	Третий этап (адаптация к <i>ex vitro</i> )	Зависит от условий	Пересадка в отдельные горшки/контейнеры. Постепенное приучение к условиям теплицы/открытого грунта (вынос на улицу). Регулярный полив и подкормки полным раствором удобрений. Контроль за вредителями и болезнями [8].

Успешная акклиматизация эустомы в условиях *ex vitro* требует тщательно подобранной среды для развития. Она должна включать в себя базовый субстрат и специализированные добавки. Нами запланирована серия экспериментов, включающая исследование различных составов субстратов на основе торфа, перлита, вермикулита и кокосового волокна, для улучшения адаптации эустомы после *in vitro* (Приложение 9). Помимо изучения влияния базовых субстратов, будет проведено исследование влияния добавок на рост и выживаемость эустомы (Приложение 9) [3]. В качестве добавок мы планируем использовать активированный уголь и удобрение пролонгированного действия торговой марки «Фертика».

Схемы опытов по подбору базовых субстратов и добавок при акклиматизации эустомы в условиях *ex vitro* представлены в приложении 9.

## Выводы

На основании выше изложенного можно сделать следующие выводы:

1. Гипохлорит натрия в концентрации 10% с экспозицией 10-15 минут, в зависимости от сорта, может быть эффективным, однако сопряжен с риском повреждения тканей и имеет узкий диапазон оптимальных концентраций. Диацид, в диапазоне концентраций 0,1% - 0,2% с экспозицией 10 минут, представляет собой перспективную альтернативу, обеспечивая сопоставимую, а в некоторых случаях и более высокую выживаемость эксплантов, при этом снижается риск повреждения тканей, делая его предпочтительным для чувствительных сортов. Выбор стерилизующего агента должен учитывать особенности каждого сорта эустомы.

2. Выявлены оптимальные концентрации БАП и ИУК для индукции побегов эустомы *in vitro*. Комбинация 1,00 мг/л БАП и 0,10 мг/л ИУК обеспечивает наилучшие результаты по количеству побегов на эксплант, проценту эксплантов с побегами и достаточной длине побегов для большинства исследуемых сортов.

3. Определены оптимальные условия для элонгации побегов эустомы, полученных *in vitro*. Установлено, что добавление 0,10 мг/л БАП и 0,50 мг/л GA3 в питательную среду MS способствует активному удлинению побегов эустомы без негативного влияния на морфологию растений для всех исследуемых сортов.

4. Наиболее эффективный ризогенез побегов эустомы *in vitro* обеспечивается при использовании среды  $\frac{1}{2}$  MS, содержащей ИМК в концентрации 1.0 мг/л. Добавление активированного угля не оказывает существенного влияния на процесс укоренения. Данная комбинация обеспечивает высокий процент укоренения, сравнительно большое количество корней и их хорошее развитие.

5. Разработана схема акклиматизации растений эустомы, полученных методом микроклонального размножения, к *ex vitro* условиям, включающая поэтапное снижение влажности и увеличение интенсивности освещения. Данный процесс гарантирует адаптацию к условиям внешней среды.

6. Эффективность разработанного протокола микроклонального размножения эустомы *in vitro* подтверждена на примере пяти различных сортов (*Eustoma grandiflorum*): Арена F1 Красный, Арена III F1 Монт Бланк, Флорида Пинк, Флорида Блю и Мариачи Кармин. Установлено, что разработанный протокол может быть адаптирован для размножения различных сортов эустомы с учетом их индивидуальных потребностей к условиям *in vitro*.

## Литература

1. Биотехнология растений: культура клеток. М.: Агропромиздат, 1989. 280 с.
2. Биотехнология сельскохозяйственных растений. М.: Агропромиздат, 1987. 302 с.
3. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. пособие / Р.Г. Бутенко. М.: ФБК–ПРЕСС, 1999. 160 с.
4. Валиханова, Г.Ж. Биотехнология растений / Г.Ж. Валиханова. Алматы: «Конжык», 1996. 272 с.
5. Высоцкий, В. А. Клональное микроразмножение растений. Киев: Наукова думка, 2003.
6. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. М.: Мир, 2002. 589 с.
7. Да Силва Х.А.Т., Нхут Д.Т., Танака М., Фукаи С. и Сивакумар Д. Лизиантус (*Eustoma grandiflorum*): развитие и перспективы после сбора урожая. Биотехнология цветоводства и декоративных растений, 1, 2006.
8. Егорова, Т.А. Основы биотехнологии: учеб. пособие / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. М.: Изд. Центр «Академия», 2003. 208 с.
9. Жученко, А. А. Экологическая генетика культурных растений. Кишинев: Штиинца, 2001
10. Иванов, А. И., Современные технологии выращивания декоративных культур. Санкт-Петербург: Профессия, 2010
11. Калинин, Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. Киев: Наукова думка, 1980. 356 с.
12. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. М., 1983. 96 с.
13. Ким Ю. Х., Ли Ю. Б. Влияние грунтования семян на всхожесть и рост проростков лизиантуса (*Eustoma grandiflorum*). Журнал Корейского общества садоводческих наук, 44 (6), 2003.
14. Ли, Дж. Х., Хео, Дж. У., Банг, К. С. Влияние интенсивности освещения на рост и цветение эустомы крупноцветковой, 2015
15. Муромцев, Г.С. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Г.С. Муромцев, Р.Г. Бутенко, Т.И. Тихоненко, М.И. Прокофьев. М.: Агропромиздат, 1990. 384 с.
16. Макдональд Б. Размножение семенами: Выращивание новых растений из семян. Тимбер Пресс. 2006
17. Першина Л.А. Культивирование изолированных клеток и тканей высших растений: учеб. пособие. Ч. 1. / Л.А. Першина. Новосибирск: НГУ, 2000. 46 с.
18. Петрова, В. П. Биологически активные вещества растений. Киев: Наукова думка, 1975.
19. Ранвала, С. М. С. К., & Миллер, У. Б. Прорастание семян эустомы крупноцветковой (*Eustoma grandiflorum*) в условиях высокой температуры. HortScience, 35 (6), 2000.

20. Ро, М. С. Физиология цветения и биотехнология лизиантуса (*Eustoma grandiflorum*). Обзоры садоводства, 24, 2000.
21. Сельскохозяйственная биотехнология: учебник / В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, Е.С. Воронин [и др.]. М.: Высш. шк., 2003. 469 с.
22. Степанов, А.В., Нестерова, А.Н. «Культура тканей растений». Учебное пособие. Санкт-Петербург: СПбГУ, 2005.
23. Смирнов, Н. А., & Васильев, А. Б. . Удобрения и стимуляторы роста в цветоводстве. Москва: Фитон+.2005
24. Sakata Seed Corporation. (Нью-Йорк). Каталог эустомы. Sakata Seed Corporation.
25. Тейшейра да Силва Х. А., Джианг Д. Т., Танака М., Нхут Д. Т. Сложные требования к регенерации растений у эустомы крупноцветковой. Размножение декоративных растений, 15 (3), 2015.
26. Тарасенко, М. Т. (). Зеленое черенкование сельскохозяйственных культур. Москва: Колос, 1967.
27. Холмквист К., Хансен Дж. Г. Систематика эустомы (*Gentianaceae-Eustomatidae*). Северный ботанический журнал, 17 (6), 1997.
28. Хейли А. С., Доул Дж. М., Макколл И. Ф. Регулирование температуры и фотопериода цветения эустомы крупноцветковой. Журнал Американского общества садоводческих наук, 128 (1), 2003.
29. Шамсутдинов, Н.Г. «Практикум по биотехнологии растений». Учебное пособие. Казань: Казанский университет, 2012.
30. Шекхар С., Кумар А. и Сингх А.К. Генетическое улучшение лизиантуса: обзор. Вегетос, 25 (2), 2012.
31. Эмбриология растений: использование в генетике, селекции и биотехнологии. Т. 1–2. М. : Агропромиздат, 1990.

## Приложения

## Приложение 1

### Схема опыта по стерилизации эксплантов эустомы раствором этанолом и гипохлорита натрия

Вариант	Концентрация гипохлорита натрия (%)	Концентрация этанола (%)	Время экспозиции (этанол) (мин)	Время экспозиции (гипохлорит) (мин)	Количество эксплантов
1 (Контроль)	0	0	0	0	20
2	5	70	3,00	5	20
3	10	70	3,00	5	20
4	15	70	3,00	5	20
5	20	70	3,00	5	20
6	5	70	3,00	10	20
7	10	70	3,00	10	20
8	15	70	3,00	10	20
9	20	70	3,00	10	20
10	5	70	3,00	15	20
11	10	70	3,00	15	20
12	15	70	3,00	15	20
13	20	70	3,00	15	20

### Схема опыта по стерилизации эксплантов эустомы раствором этанола и диацида

Вариант	Концентрация гипохлорита натрия (%)	Концентрация этанола (%)	Время экспозиции (этанол) (мин)	Время экспозиции (гипохлорит) (мин)	Количество эксплантов
1 (Контроль)	0	0	0	0	20
2	0,1	70	3,00	5	20
3	0,2	70	3,00	5	20
4	0,3	70	3,00	5	20
5	0,1	70	3,00	5	20
6	0,2	70	3,00	10	20
7	0,3	70	3,00	10	20
8	0,1	70	3,00	10	20
9	0,2	70	3,00	10	20
10	0,3	70	3,00	15	20

## Приложение 2

Схемы экспериментов по индукции, элонгации (удлинения) побегов и ризогенезу (укоренения) побегов сортов эустомы.

### Схема эксперимента по оптимизации индукции побегов

Вариант	Среда	БАП (мг/л)	ИУК (мг/л)	Число повторностей	Число фласок	Кол-во эксплантов на фласку
1	MS	0	0	5	5	5
2	MS	0.5	0	5	5	5
3	MS	1.0	0	5	5	5
4	MS	2.0	0	5	5	5
5	MS	3.0	0	5	5	5
6	MS	0.5	0.1	5	5	5
7	MS	1.0	0.1	5	5	5
8	MS	2.0	0.1	5	5	5
9	MS	3.0	0.1	5	5	5
10	MS	0.5	0.5	5	5	5
11	MS	1.0	0.5	5	5	5
12	MS	2.0	0.5	5	5	5
13	MS	3.0	0.5	5	5	5
14	MS	0.5	1.0	5	5	5
15	MS	1.0	1.0	5	5	5
16	MS	2.0	1.0	5	5	5

### Схема эксперимента по оптимизации элонгации (удлинения) побегов

Вариант	Среда	БАП (мг/л)	GA3 (мг/л)	Число повторностей	Число фласок	Кол-во побегов на фласку
1	MS	0	0	5	5	5
2	MS	0.1	0	5	5	5
3	MS	0.1	0.1	5	5	5
4	MS	0.1	0.5	5	5	5
5	MS	0.1	1.0	5	5	5
6	MS	0.25	0.1	5	5	5
7	MS	0.25	0.5	5	5	5
8	MS	0.25	1.0	5	5	5

### Схема эксперимента по оптимизации ризогенеза (укоренения) побегов

Вариант	Среда	ИМК (мг/л)	Активированный уголь (г/л)	Число повторностей	Число фласок	Кол-во побегов фласку
1	½ MS	0	0	5	5	5
2	½ MS	0.5	0	5	5	5
3	½ MS	1.0	0	5	5	5
4	½ MS	2.0	0	5	5	5
5	½ MS	3.0	0	5	5	5
6	½ MS	0.5	1	5	5	5
7	½ MS	1.0	1	5	5	5
8	½ MS	2.0	1	5	5	5
9	½ MS	3.0	1	5	5	5
10	½ MS	0.5	2	5	5	5
11	½ MS	1.0	2	5	5	5
12	½ MS	2.0	2	5	5	5
13	½ MS	3.0	2	5	5	5

### Приложение 3

#### Влияние концентрации гипохлорита натрия и времени экспозиции на выживаемость эксплантов сортов эустомы

Вариант	Концентрация гипохлорита натрия (%)	Время экспозиции (гипохлорит) (мин)	Процент выживаемости (%)	Процент контаминации/гибели (%)
1	2	3	4	5
<b>Сорт Арена F1 красный</b>				
1 контроль	0	0	5	95
2	5	5	40	60
3	10	5	60	40
4	15	5	63	37
5	20	5	63	37
6	5	10	58	42
7	10	10	90	10
8	15	10	80	20
9	20	10	60	40
10	5	15	54	46
11	10	15	85	15
12	15	15	80	20
13	20	15	45	55
<b>Сорт Арена III F1 Монт Бланк</b>				
1 контроль	0	0	5	95
2	5	5	40	60
3	10	5	55	45
4	15	5	55	45
5	20	5	60	40
6	5	10	55	45
7	10	10	85	15
8	15	10	80	20
9	20	10	65	35
10	5	15	70	30
11	10	15	90	10
12	15	15	65	45
13	20	15	40	60
<b>Сорт Флорида Пинк</b>				
1 контроль	0	0	8	92
2	5	5	35	65
3	10	5	45	55
4	15	5	45	55
5	20	5	55	45
6	5	10	60	40
7	10	10	85	15
8	15	10	70	30
9	20	10	55	45
10	5	15	70	30
11	10	15	90	10

12	15	15	65	35
13	20	15	50	50
<b>Сорт Флорида Блю</b>				
1 контроль	0	0	10	90
2	5	5	40	60
3	10	5	50	50
4	15	5	45	55
5	20	5	45	55
6	5	10	50	50
7	10	10	80	20
8	15	10	80	20
9	20	10	50	50
10	5	15	65	35
11	10	15	75	25
12	15	15	60	40
13	20	15	30	70
<b>Сорт Мариачи Кармин</b>				
1 контроль	0	0	0	100
2	5	5	30	70
3	10	5	45	55
4	15	5	45	55
5	20	5	40	60
6	5	10	75	25
7	10	10	85	15
8	15	10	60	40
9	20	10	40	60
10	5	15	70	30
11	10	15	70	30
12	15	15	50	50
13	20	15	50	50

**Влияние концентрации диацида и времени экспозиции на выживаемость  
эксплантов сортов эустомы**

Вариант	Концентрация диацида (%)	Время экспозиции (диацид) (мин)	Процент выживаемости (%)	Процент контаминации/гибели (%)
1	2	3	4	5
<b>Сорт Арена F1 красный</b>				
1 (Контроль)	0	0	5	95
2	0,1	5	60	40
3	0,2	5	70	30
4	0,3	5	65	35
5	0,1	10	75	25
6	0,2	10	80	20
7	0,3	10	75	25
8	0,1	15	80	20
9	0,2	15	80	20
10	0,3	15	78	22
<b>Сорт Арена III F1 Монт Бланк</b>				
1 (Контроль)	0	0	5	95
2	0,1	5	65	35
3	0,2	5	75	25
4	0,3	5	70	30
5	0,1	10	80	20
6	0,2	10	85	15
7	0,3	10	80	20
8	0,1	15	80	20
9	0,2	15	80	20
10	0,3	15	75	25
<b>Сорт Флорида Пинк</b>				
1 (Контроль)	0	0	8	92
2	0,1	5	55	45
3	0,2	5	65	35
4	0,3	5	60	40
5	0,1	10	70	30
6	0,2	10	75	25
7	0,3	10	75	25
8	0,1	15	83	17
9	0,2	15	80	20
10	0,3	15	78	22
<b>Сорт Флорида Блю</b>				
1 (Контроль)	0	0	10	90
2	0,1	5	60	40
3	0,2	5	70	30
4	0,3	5	65	35
5	0,1	10	75	25
6	0,2	10	80	20
7	0,3	10	75	25
8	0,1	15	70	30

9	0,2	15	70	30
10	0,3	15	70	30
<b>Сорт Мариачи Кармин</b>				
1 (Контроль)	0	0	0	100
2	0,1	5	45	55
3	0,2	5	55	45
4	0,3	5	50	50
5	0,1	10	65	35
6	0,2	10	70	30
7	0,3	10	70	30
8	0,1	15	73	27
9	0,2	15	73	27
10	0,3	15	70	30

**Влияние концентрации БАП и ИУК на стимуляцию процесса индукции побегов различных сортов эустомы**

Вариант	БАП (мг/л)	ИУК (мг/л)	Кол-во побегов / экплант	Длина побегов (мм)	% экплантов с побегами
1	2	3	4	5	6
<b>Арена III F1 Монт Бланк</b>					
1	0,00	0,00	0,58 ± 0,20	2,25 ± 0,12	20,80
2	0,50	0,00	5,25 ± 0,80	5,67 ± 0,50	73,60
3	1,00	0,00	6,88 ± 0,90	7,20 ± 0,60	81,60
4	2,00	0,00	5,65 ± 0,90	6,20 ± 0,75	76,00
5	3,00	0,00	5,00 ± 0,70	4,55 ± 0,75	60,00
6	0,50	0,10	7,15 ± 0,80	6,50 ± 0,50	80,80
7	1,00	0,10	9,50 ± 1,10	8,45 ± 1,00	91,20
8	2,00	0,10	8,20 ± 0,70	7,52 ± 1,10	80,00
9	3,00	0,10	3,50 ± 0,60	4,44 ± 0,26	56,00
10	0,50	0,50	4,20 ± 0,40	4,50 ± 0,50	59,20
11	1,00	0,50	5,30 ± 0,20	5,56 ± 0,85	69,60
12	2,00	0,50	3,30 ± 0,5	3,64 ± 0,60	52,80
13	3,00	0,50	2,80 ± 0,25	3,10 ± 0,40	40,00
14	0,50	1,00	2,50 ± 0,25	4,34 ± 0,84	42,40
15	1,00	1,00	3,65 ± 0,45	2,00 ± 0,20	52,80
16	2,00	1,00	1,80 ± 0,20	2,00 ± 0,20	37,60
<b>Флорида Пинк</b>					
1	0,00	0,00	0,80 ± 0,10	1,65 ± 0,24	12,80
2	0,50	0,00	4,60 ± 0,50	5,33 ± 0,65	66,40
3	1,00	0,00	5,00 ± 0,85	6,30 ± 1,00	80,00
4	2,00	0,00	4,70 ± 0,44	6,60 ± 0,80	88,00
5	3,00	0,00	4,80 ± 0,45	5,46 ± 0,72	72,00
6	0,50	0,10	6,90 ± 0,30	7,00 ± 0,50	72,60
7	1,00	0,10	6,70 ± 0,62	6,66 ± 1,10	67,20
8	2,00	0,10	4,00 ± 0,80	4,58 ± 0,44	60,00
9	3,00	0,10	3,50 ± 0,25	3,60 ± 0,40	52,00
10	0,50	0,50	2,50 ± 0,30	3,00 ± 0,25	44,00
11	1,00	0,50	3,80 ± 0,47	4,45 ± 0,34	57,60
12	2,00	0,50	3,50 ± 0,50	3,48 ± 0,24	50,40
13	3,00	0,50	2,28 ± 0,44	2,47 ± 0,32	39,20
14	0,50	1,00	1,58 ± 0,35	1,90 ± 0,38	36,00
15	1,00	1,00	2,85 ± 0,45	3,27 ± 0,46	49,60
16	2,00	1,00	2,20 ± 0,25	2,53 ± 0,32	40,80
<b>Арена F1 Красный</b>					
1	0,00	0,00	0,44 ± 0,12	1,82 ± 0,37	17,60
2	0,50	0,00	5,62 ± 0,84	6,00 ± 1,00	76,80
3	1,00	0,00	5,37 ± 1,25	6,64 ± 1,30	88,00
4	2,00	0,00	5,20 ± 1,00	6,67 ± 1,10	80,00
5	3,00	0,00	4,45 ± 0,75	5,88 ± 0,96	80,00
6	0,50	0,10	6,20 ± 1,12	6,83 ± 1,13	92,80
7	1,00	0,10	8,10 ± 1,00	7,77 ± 1,10	84,00
8	2,00	0,10	7,88 ± 0,53	7,10 ± 0,65	80,00

9	3,00	0,10	3,49 ± 0,74	4,25 ± 0,83	62,40
10	0,50	0,50	1,90 ± 0,30	2,50 ± 0,40	51,20
11	1,00	0,50	5,90 ± 0,20	2,36 ± 0,38	40,00
12	2,00	0,50	4,32 ± 0,46	4,65 ± 0,70	66,40
13	3,00	0,50	2,57 ± 0,44	3,11 ± 0,57	54,00
14	0,50	1,00	3,10 ± 0,23	2,85 ± 0,36	35,20
15	1,00	1,00	3,15 ± 0,45	2,34 ± 0,48	44,00
16	2,00	1,00	1,88 ± 0,25	2,40 ± 0,20	29,60
<b>Мариачи Кармин</b>					
1	0,00	0,00	0,29 ± 0,10	1,35 ± 0,23	16,00
2	0,50	0,00	4,38 ± 0,55	4,76 ± 0,74	68,00
3	1,00	0,00	5,40 ± 0,26	6,00 ± 1,00	83,20
4	2,00	0,00	4,50 ± 0,40	5,10 ± 0,73	76,80
5	3,00	0,00	3,90 ± 0,30	4,30 ± 0,70	61,60
6	0,50	0,10	5,10 ± 0,20	1,54 ± 0,26	50,40
7	1,00	0,10	6,58 ± 0,45	6,15 ± 0,52	76,00
8	2,00	0,10	6,45 ± 0,30	6,00 ± 0,50	83,60
9	3,00	0,10	2,85 ± 0,26	3,67 ± 0,64	52,00
10	0,50	0,50	2,70 ± 0,30	3,48 ± 0,45	36,00
11	1,00	0,50	2,25 ± 0,15	2,70 ± 0,26	36,00
12	2,00	0,50	2,56 ± 0,23	3,26 ± 0,38	57,60
13	3,00	0,50	2,00 ± 0,30	2,66 ± 0,44	47,20
14	0,50	1,00	2,30 ± 0,45	3,10 ± 0,40	44,00
15	1,00	1,00	2,45 ± 0,25	4,34 ± 0,84	49,60
16	2,00	1,00	1,80 ± 0,18	1,80 ± 0,20	23,20
<b>Флорида Блю</b>					
1	0,00	0,00	0,33 ± 0,10	2,15 ± 0,32	8,00
2	0,50	0,00	3,30 ± 0,44	2,33 ± 0,56	75,20
3	1,00	0,00	5,10 ± 0,56	5,68 ± 0,71	87,20
4	2,00	0,00	6,60 ± 0,33	2,44 ± 0,66	63,20
5	3,00	0,00	6,30 ± 0,70	4,79 ± 0,77	64,80
6	0,50	0,10	7,70 ± 0,45	7,66 ± 0,95	68,00
7	1,00	0,10	7,85 ± 0,80	6,70 ± 1,10	80,00
8	2,00	0,10	7,75 ± 0,68	5,84 ± 0,54	76,00
9	3,00	0,10	5,46 ± 0,37	5,90 ± 0,80	44,00
10	0,50	0,50	3,82 ± 0,28	4,70 ± 0,88	26,40
11	1,00	0,50	3,00 ± 0,50	3,30 ± 0,50	16,80
12	2,00	0,50	5,15 ± 1,20	4,69 ± 0,39	61,60
13	3,00	0,50	3,40 ± 0,43	2,66 ± 0,54	19,20
14	0,50	1,00	2,80 ± 0,35	3,22 ± 0,40	32,00
15	1,00	1,00	1,88 ± 0,25	4,34 ± 0,80	43,20
16	2,00	1,00	1,80 ± 0,20	2,40 ± 0,34	22,40

**Приложение 6**

**Влияние концентрации БАП и ГА3 на стимуляцию процесса элонгация побегов различных сортов эустомы**

Вариант	БАП (мг/л)	ГА3 (мг/л)	Средняя длина побега (мм)	% побегов с элонгацией	Внешний вид побегов
1	2	3	4	5	6
<b>Арена F1 Красный</b>					
1	0,00	0,00	8,20 ± 1,50	52,80	Короткие, толстые
2	0,10	0,00	14,50 ± 2,20	81,60	Умеренно длинные, нормальные
3	0,10	0,10	22,60 ± 3,52	92,80	Длинные, тонкие
4	0,10	0,50	18,66 ± 2,60	84,80	Длинные, нормальные
5	0,10	1,00	14,40 ± 2,20	75,20	Умеренно длинные, нормальные
6	0,25	0,10	19,00 ± 2,55	91,20	Длинные, немного толще, чем в оптим. варианте
7	0,25	0,50	17,40 ± 2,40	80,00	Длинные, немного короче, чем в оптим. варианте
8	0,25	1,00	14,00 ± 2,14	72,00	Умеренно длинные, нормальные
<b>Арена III F1 Монт Бланк</b>					
1	0,00	0,00	7,20 ± 1,50	56,00	Короткие, толстые
2	0,10	0,00	12,60 ± 2,20	79,20	Умеренно длинные, нормальные
3	0,10	0,10	19,44 ± 3,40	91,20	Длинные, тонкие
4	0,10	0,50	18,80 ± 2,60	83,20	Длинные, нормальные
5	0,10	1,00	12,50 ± 2,00	76,00	Умеренно длинные, нормальные
6	0,25	0,10	17,77 ± 2,85	88,00	Длинные, немного толще, чем в оптим. варианте
7	0,25	0,50	16,34 ± 2,50	82,40	Длинные, немного короче, чем в оптим. варианте
8	0,25	1,00	15,23 ± 2,18	68,00	Умеренно длинные, нормальные
<b>Флорида Пинк</b>					
1	0,00	0,00	6,30 ± 1,28	64,00	Короткие, толстые
2	0,10	0,00	13,00 ± 2,70	91,20	Умеренно длинные, нормальные
3	0,10	0,10	16,50 ± 4,10	97,60	Длинные, тонкие
4	0,10	0,50	16,80 ± 2,20	84,00	Умеренно длинные, нормальные
5	0,10	1,00	16,90 ± 2,90	95,20	Длинные, нормальные
6	0,25	0,10	15,56 ± 3,15	96,00	Длинные, немного толще, чем в оптим. варианте
7	0,25	0,50	14,30 ± 2,70	90,40	Длинные, немного короче, чем в оптим. варианте
8	0,25	1,00	14,00 ± 2,30	80,00	Умеренно длинные, нормальные

<b>Флорида Блю</b>					
1	0,00	0,00	6,19 ± 1,10	47,20	Короткие, толстые
2	0,10	0,00	11,00 ± 2,00	76,00	Умеренно длинные, нормальные
3	0,10	0,10	16,70 ± 2,74	88,00	Длинные, тонкие
4	0,10	0,50	13,48 ± 2,55	80,80	Длинные, нормальные
5	0,10	1,00	10,39 ± 1,23	62,40	Умеренно длинные, нормальные
6	0,25	0,10	13,22 ± 2,65	86,40	Длинные, немного толще, чем в оптимальном варианте
7	0,25	0,50	11,48 ± 2,16	76,00	Длинные, немного короче, чем в оптимальном варианте
8	0,25	1,00	10,30 ± 1,35	68,00	Умеренно длинные, нормальные
<b>Мариачи Кармин</b>					
1	0,00	0,00	8,00 ± 1,60	60,80	Короткие, толстые
2	0,10	0,00	14,00 ± 2,30	79,20	Умеренно длинные, нормальные
3	0,10	0,10	21,00 ± 3,10	92,00	Длинные, тонкие
4	0,10	0,50	13,50 ± 2,14	77,60	Умеренно длинные, нормальные
5	0,10	1,00	17,00 ± 2,64	88,00	Длинные, нормальные
6	0,25	0,10	20,00 ± 2,90	92,00	Длинные, немного толще, чем в оптимальном варианте
7	0,25	0,50	17,30 ± 2,56	85,60	Длинные, немного короче, чем в оптимальном варианте
8	0,25	1,00	14,50 ± 2,22	76,00	Умеренно длинные, нормальные

**Приложение 7**

**Влияние концентрации ИМК и Активированного угля на стимуляцию процесса ризогенеза побегов различных сортов эустомы**

Вариант	ИМК (мг/л)	Активированный уголь (г/л)	% укоренившихся побегов	Среднее число корней на побег	Длина самого длинного корня (мм)	Внешний вид корней
1	2	3	4	5	6	7
<b>Флорида Пинк</b>						
1	0,00	0,00	4,00	0,54 ± 0,09	1,00 ± 0,07	Очень мало, тонкие
2	0,50	0,00	60,80	4,46 ± 0,80	8,00 ± 1,50	Нормальные
3	1,00	0,00	73,60	5,94 ± 0,94	11,00 ± 2,10	Хорошие
4	2,00	0,00	66,40	5,26 ± 1,10	9,00 ± 1,80	Хорошие
5	3,00	0,00	57,60	3,54 ± 0,32	7,30 ± 1,10	Нормальные
6	0,50	1,00	68,80	6,64 ± 0,85	8,90 ± 0,95	Отличные
7	1,00	1,00	75,20	7,09 ± 1,10	13,30 ± 2,00	Отличные
8	2,00	1,00	72,80	5,49 ± 0,68	9,80 ± 1,20	Хорошие
9	3,00	1,00	68,80	4,55 ± 0,70	8,15 ± 0,86	Хорошие
10	0,50	2,00	59,20	3,50 ± 0,50	7,00 ± 1,10	Нормальные
11	1,00	2,00	65,60	4,50 ± 0,80	8,80 ± 2,00	Отличные
12	2,00	2,00	55,20	3,10 ± 0,60	6,20 ± 0,60	Нормальные
13	3,00	2,00	50,40	2,00 ± 0,25	4,00 ± 1,00	Тонкие
<b>Арена III F1 Монт Бланк</b>						
1	0,00	0,00	10,40	1,00 ± 0,07	2,50 ± 0,80	Тонкие, мало
2	0,50	0,00	55,20	3,97 ± 0,44	7,43 ± 1,00	Нормальные
3	1,00	0,00	70,40	6,66 ± 0,40	10,90 ± 2,10	Хорошие
4	2,00	0,00	64,80	5,20 ± 0,55	9,00 ± 0,50	Хорошие
5	3,00	0,00	60,00	3,50 ± 0,42	7,67 ± 0,80	Нормальные
6	0,50	1,00	64,80	4,66 ± 0,88	8,50 ± 1,10	Отличные
7	1,00	1,00	80,00	7,77 ± 0,65	13,80 ± 2,20	Отличные
8	2,00	1,00	75,20	5,70 ± 0,80	11,22 ± 1,35	Отличные
9	3,00	1,00	70,40	4,80 ± 1,00	8,80 ± 0,80	Хорошие
10	0,50	2,00	60,00	3,55 ± 0,60	6,50 ± 0,80	Нормальные
11	1,00	2,00	64,80	4,40 ± 0,70	8,56 ± 1,00	Отличные
12	2,00	2,00	55,20	2,49 ± 0,61	5,55 ± 0,78	Нормальные
13	3,00	2,00	50,40	1,50 ± 0,40	3,40 ± 0,44	Тонкие
<b>Арена F1 Красный</b>						
1	0,00	0,00	20,00	1,50 ± 0,15	3,40 ± 0,95	Тонкие, мало
2	0,50	0,00	65,60	4,88 ± 0,63	8,44 ± 1,12	Нормальные
3	1,00	0,00	80,00	7,50 ± 1,00	12,22 ± 2,00	Хорошие
4	2,00	0,00	75,20	5,95 ± 0,95	10,00 ± 2,20	Хорошие
5	3,00	0,00	68,80	4,50 ± 1,00	8,50 ± 1,80	Нормальные
6	0,50	1,00	70,40	5,64 ± 0,74	9,50 ± 1,14	Хорошие
7	1,00	1,00	90,40	8,71 ± 1,10	15,00 ± 2,00	Отличные
8	2,00	1,00	84,80	6,50 ± 1,30	12,00 ± 2,10	Хорошие
9	3,00	1,00	80,00	5,46 ± 0,92	10,00 ± 1,56	Хорошие
10	0,50	2,00	65,60	4,50 ± 0,80	7,47 ± 0,80	Отличные
11	1,00	2,00	70,40	5,50 ± 0,75	9,71 ± 1,10	Отличные

12	2,00	2,00	60,00	3,60 ± 0,90	6,50 ± 0,95	Нормальные
13	3,00	2,00	55,20	2,50 ± 0,45	4,66 ± 0,86	Тонкие
<b>Флорида Блю</b>						
1	0,00	0,00	8,00	0,86 ± 0,10	2,20 ± 0,50	Тонкие, мало
2	0,50	0,00	50,40	3,54 ± 0,67	7,00 ± 1,20	Нормальные
3	1,00	0,00	66,40	6,00 ± 1,00	9,91 ± 1,10	Хорошие
4	2,00	0,00	60,00	4,72 ± 0,66	8,00 ± 1,00	Хорошие
5	3,00	0,00	56,00	3,00 ± 0,80	6,38 ± 0,53	Нормальные
6	0,50	1,00	60,00	4,60 ± 0,75	7,50 ± 0,80	Хорошие
7	1,00	1,00	75,20	6,90 ± 1,00	14,11 ± 1,55	Отличные
8	2,00	1,00	70,40	4,98 ± 0,84	10,40 ± 1,20	Отличные
9	3,00	1,00	64,80	3,86 ± 0,93	8,00 ± 1,00	Хорошие
10	0,50	2,00	55,20	3,00 ± 0,60	6,00 ± 1,10	Отличные
11	1,00	2,00	60,00	4,00 ± 0,85	7,44 ± 0,46	Отличные
12	2,00	2,00	50,40	2,48 ± 0,46	5,50 ± 0,86	Нормальные
13	3,00	2,00	44,80	1,77 ± 0,20	3,30 ± 0,90	Тонкие
<b>Мариачи Кармин</b>						
1	0,00	0,00	12,00	1,13 ± 0,20	2,64 ± 0,20	Тонкие, мало
2	0,50	0,00	57,60	4,41 ± 0,80	7,80 ± 1,00	Нормальные
3	1,00	0,00	72,80	6,64 ± 1,00	10,50 ± 0,51	Хорошие
4	2,00	0,00	68,00	5,26 ± 0,53	9,33 ± 0,70	Хорошие
5	3,00	0,00	63,20	3,80 ± 0,50	7,73 ± 1,10	Нормальные
6	0,50	1,00	68,00	4,80 ± 1,00	8,88 ± 1,00	Отличные
7	1,00	1,00	83,20	7,77 ± 0,82	13,5 ± 1,30	Отличные
8	2,00	1,00	77,60	5,76 ± 0,40	11,44 ± 1,40	Отличные
9	3,00	1,00	72,80	4,77 ± 0,91	9,55 ± 1,00	Хорошие
10	0,50	2,00	63,20	3,80 ± 0,6	6,77 ± 0,56	Нормальные
11	1,00	2,00	68,00	4,89 ± 0,68	8,80 ± 1,00	Хорошие
12	2,00	2,00	58,40	3,30 ± 0,50	6,27 ± 0,84	Нормальные
13	3,00	2,00	52,80	2,30 ± 0,40	4,40 ± 1,00	Тонкие

## Приложение 8

### Данные для расчета экономической эффективности

Материал/ Реактив	Ед. измерения	Кол-во	Цена за ед. руб.)	Общая стоимость (руб.)	Примечание
<b>Индукция (на 2000 эксплантов)</b>					
MS среда (порошок)	г	50	50	2500	Расчет необходимого объема среды для 2000 эксплантов (с учетом потерь, примерно 25 л среды MS)
БАП	мг	5	600	3000	5 мг/л, 25 л среды MS, 5*25 = 125мг +75мг
ИУК	мг	10	200	2000	5 мг/л, 25 л среды MS, 5*25 = 125мг. + 80мг
Агар	г	375	250	9375	15 г/л, 25 л среды MS, 15*25= 375гр
Дистиллированная вода	л	25	15	375	
<b>Итого по этапу индукции</b>				<b>17250</b>	
<b>Элонгация (на 1200 эксплантов)</b>					
MS среда (порошок)	г	30	50	1500	Расчет необходимого объема среды для 1200 эксплантов (с учетом потерь, примерно 15 л среды MS)
БАП	мг	3	600	1800	5 мг/л, 15 л среды MS, 5*15=75мг. Возьмем с запасом + 45мг
GA3	мг	1	300	300	2 мг/л, 15 л среды MS, 2*15=30мг +70 мг
Агар	г	225	25	5625	15 г/л, 15 л среды MS, 15*15= 225гр
Дистиллированная вода	л	15	15	225	
<b>Итого по этапу элонгации</b>				<b>9450</b>	
<b>Ризогенез (на 975 эксплантов)</b>					
MS среда (порошок)	г	15	50	750	Используется ½ MS. Расчет необходимого объема среды для 975 эксплантов (с учетом потерь, примерно 7,5 л среды MS)
ИМК	мг	47.5	500	23750	5 мг/л, 7,5 л среды MS, 5*7.5= 37.5мг +10мг
Активированный уголь	г	75	30	2250	10 г/л, 7,5 л среды MS, 10*7,5=75гр
Агар	г	112.5	25	2812.5	15 г/л, 7.5 л среды MS, 15*7.5=112,5гр.
Дистиллированная вода	л	7.5	15	112.5	
<b>Итого по этапу ризогенеза</b>				<b>29675</b>	
<b>Общие расходные материалы (все этапы)</b>					
Спирт	л	5	200	1000	
Вата/салфетки	упак	2	150	300	

Перчатки одно-разовые	пар	5	50	250	
Бумага для автоклава	рул	1	400	400	
<b>Итого на общие расходные материалы</b>				<b>1950</b>	
<b>ИТОГО затрат на материалы (все этапы)</b>				<b>58325</b>	

#### Расчет затрат на электроэнергию

Оборудование	Мощность (Вт)	Время работы (часы)	Стоимость 1 кВт*ч (руб.)	Общая стоимость (руб.)	Обоснование/Примечание
Лампы для культивирования (FitoLed 45W Red)	270 (6 *45)	504 (16 часов в день x 31,5 дней)	5 (день)/ 2.5 (ночь)	2449,44	Расчет: (Мощность (кВт) * Время работы (часы) * Количество дней)/1000 * Стоимость 1 кВт*ч. Мощность указана общая для 6 ламп. Y – общее время работы ламп на всех этапах с учетом фотопериода. Дневные часы - 8 часов, ночные часы 8 часов
Автоклав	2000	21 (7 дней в неделю 3 цикла каждый раз)	5	270	Расчет: (Мощность (кВт) * Время работы (часы) * Количество циклов)/1000 * Стоимость 1 кВт*ч. Учитывается время на прогрев, стерилизацию и остывание.
Ламинарный бокс	150	104 (4 часа в день x26 дней)	5	78	Расчет: (Мощность (кВт) * Время работы (часы) * Количество дней)/1000 * Стоимость 1 кВт*ч.
Итого:				<b>2797,44</b>	

#### Расчет себестоимости одного экспланта

Статья затрат	Сумма (руб.)
Затраты на материалы (из таблицы 1)	58325
Затраты на оплату труда (из таблицы 2)	31200
Затраты на электроэнергию (из таблицы 3)	2797
<b>ИТОГО совокупные затраты</b>	<b>92322</b>
<b>Итого:</b>	<b>96,17</b>

## Приложение 9

### Схема опыта по подбору базовых субстратов при акклиматизации эустомы в условиях *ex vitro*

№	Состав субстрата	Описание	Количество повторностей	Количество растений на повторность
1	Торф: Перлит: Вермикулит (2:1:1)	Стандартная смесь для акклиматизации растений <i>in vitro</i> [3].	5	15
2	Кокосовое волокно: Перлит (2:1)	Альтернативная смесь на основе кокосового волокна, оценивается за аэрацию и влагоудерживающую способность [11].	5	15
3	Торф:Перлит (3:1)	Смесь с повышенной влагоудерживающей способностью, важно обеспечить хороший дренаж.	5	15

### Схема опыта по подбору добавок при акклиматизации эустомы в условиях *ex vitro*

№	Состав субстрата	Описание	Количество повторностей	Количество растений на повторность
1	Торф: Перлит: Вермикулит (2:1:1)	Контроль (базовый субстрат) [3].	5	15
2	Торф: Перлит: Вермикулит (2:1:1) + Активированный уголь (1 г/л)	Активированный уголь способствует адсорбции токсинов и улучшению дренажа [15].	5	15
3	Торф: Перлит: Вермикулит (2:1:1) + Удобрение пролонгированного действия «Фертика»	Обеспечивает постепенное высвобождение питательных веществ, снижая риск передозировки [17].	5	15