

УДК 582.734.4:581.16

КЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ РОЗЫ ЭФИРОМАСЛИЧНОЙ (*ROSA L.*) *IN VITRO*

Шкопинский Е.А., *Таланкова-Середа Т.Е., Гриценко Ю.Ю., Добридень А.А., Гетьман А.А.

Запорожский национальный университет

69600, Украина, Запорожье, ул. Жуковского, 66

*Медицинский колледж Запорожского государственного медицинского университета

69027, Украина, Запорожье, ул. Космическая, 2В

tt77-07@mail.ru

На базе предприятия ООО «КРЫМАГРОСОЮЗ» в январе 2014 года начала работу лаборатория «Биотехнологии микрклонального размножения», основной задачей которой является получение высококачественного, здорового посадочного материала, свободного от вирусных, грибковых и бактериальных заболеваний. В данной работе предложен эффективный способ стерилизации почек эфиромасличной розы сортов Радуга, Лань и Лада при введении *in vitro*. Наибольшую жизнеспособность эксплантов 80 % наблюдали при ступенчатой стерилизации 20% пергидролом – 2 минуты, 70% этанолом в экспозиции 1 минуту и раствором «Доместос» в разведении 2:1 в экспозиции 10 минут. Приживаемость меристемных эксплантов розы сорта Радуга на питательной среде MS3 (содержащей 2,0 мг/л кинетина, 0,04 мг/л индолилуксусной кислоты, 1,0 мг/л гиббереллиновой кислоты, 25,0 мг/л аскорбиновой кислоты) была значительно выше, чем на остальных вариантах питательных сред. Для роз сорта Лань более продуктивной показала себя среда MS2 (содержащая 1,0 мг/л кинетина, 0,04 мг/л индолилуксусной кислоты, 1,0 мг/л гиббереллиновой кислоты, 25,0 мг/л аскорбиновой кислоты), а лучшая приживаемость роз сорта Лада наблюдалась на двух средах: MS2 (содержащей 1,0 мг/л кинетина, 0,04 мг/л индолилуксусной кислоты, 1,0 мг/л гиббереллиновой кислоты, 25,0 мг/л аскорбиновой кислоты) и MS4 (содержащей 1,0 мг/л кинетина, 0,2 мг/л индолилуксусной кислоты, 1,0 мг/л гиббереллиновой кислоты, 25,0 мг/л аскорбиновой кислоты).

Ключевые слова: микрклональное размножение, стерилизация эксплантов, питательная среда, роза эфиромасличная сорта Радуга, роза эфиромасличная сорта Лань, роза эфиромасличная сорта Лада

КЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ ТРОЯНДИ ЕФІРООЛІЙНОЇ (*ROSA L.*) *IN VITRO*

Шкопинський Є.О., *Таланкова-Середа Т.Є., Гриценко Ю.Ю., Добридень А.А., Гетьман А.О.

Запорізький національний університет

69600, Україна, Запоріжжя, вул. Жуковського, 66

*Медичний коледж запорізького державного медичного університету

69027, Україна, Запоріжжя, вул. Космічна, 2В

tt77-07@mail.ru

На базі підприємства ТОВ «КРИМАГРОСОЮЗ» у січні 2014 року почала роботу лабораторія «Біотехнології микрклонального розмноження», основною задачею якої є отримання високоякісного, здорового посадкового матеріалу, вільного від вірусних, грибних та бактеріальних хвороб. В даній роботі запропонований ефективний спосіб стерилізації бруньок ефіроолійної рози сортів Радуга, Лань та Лада при введенні *in vitro*. Найбільшу життєздатність експлантів 80 % спостерігали при ступінчастій стерилізації 20% пергидролом – 2 хвилини, 70% етанолом в експозиції 1 хвилину та розчином «Доместос» у розведенні 2:1 в експозиції 10 хвилин. Приживлюваність меристемних експлантів троянди сорту Радуга на поживному середовищі MS3 (містить 2,0 мг/л кінетину, 0,04 мг/л індолилоцтової кислоти, 1,0 мг/л гіберелінової кислоти, 25,0 мг/л аскорбінової кислоти), була значно вище, ніж на інших варіантах поживних середовищ. Для троянд сорту Лань більш продуктивним виявилось середовище MS2 (містить 1,0 мг/л кінетину, 0,04 мг/л індолилоцтової кислоти, 1,0 мг/л гіберелінової кислоти, 25,0 мг/л аскорбінової кислоти), а найкраща приживлюваність троянд сорту Лань спостерігалась на двох середовищах: MS2 (містить 1,0 мг/л кінетина, 0,04 мг/л індолилоцтової кислоти, 1,0 мг/л гіберелінової кислоти, 25,0 мг/л аскорбінової кислоти) і MS4 (містить 1,0 мг/л кінетину, 0,2 мг/л індолилоцтової кислоти, 1,0 мг/л гіберелінової кислоти, 25,0 мг/л аскорбінової кислоти).

Ключові слова: микрклонавання, стерилізація експлантів, поживне середовище, роза ефіроолійна сорту Радуга, роза ефіроолійна сорту Лань, роза ефіроолійна сорту Лада

MICROCLONAL PROPAGATION OF ESSENTIAL OIL-ROSE (*ROSA L.*) *IN VITRO*

Shkopinskii E.A., *Talankova-Sereda T.E., Gritsenko Y.Y., Dobriden A.A., Getman A.A.

Zaporozhian national university

69600, Ukraine, Zaporozhye, Zhukovskogo street, 66

*Medical college of Zaporozhian state medical university

69027, Ukraine, Zaporozhye, Kosmicheskaya street, 2V

tt77-07@mail.ru

Rose is one of the main essential oil cultures, which is grown up in AR Crimea. Now the proprietor of all variety of essential oil rose, brought in «State register of plant variety of Ukraine» is Crimea agriculture institute. Authors of variety Lan, Raduga and Lada are L.G.Nazarenko and L.A.Grishchenko.

On the basis of Co Ltd “Krymagrosoyuz” enterprise in January 2014 was opened laboratory of “Microcloned reproduction biotechnology”. The main aim of its opening was reception of a high-quality healthy planting stock, which is free from virus, fungi and bacterial diseases.

The effective way of essential oil rose variety Raduga, Lan, Lada gemmae sterilization at introduction *in vitro* is offered in given work. Updated Murasige and Skuga growth medium are offered for introduction in essential oil rose plants culture.

Objective of this research is selection of effective sterilization methods of placed into culture rose variety Raduga, Lan, Lada explants, and also growth mediums for introduction in culture that allows to increase quantity and to accelerate explants reception for the further microreproduction.

As initial material for research were used essential oil rose plants of variety Raduga, Lan, Lada. Shoots for research were taken in November in AR Crimea. They remained in refrigerating chamber at temperature +3-5 C° in wet fabric in air-locked containers.

Preparation of laboratory plates and dishes, tools and growth medium preparation were made for work by the standard techniques. For explants cultivation test glasses 1,5 x 16 sm with volume of a growth medium 10 ml and flasks Erlenmeyer with volume 100 ml which contained 20 ml of growth medium were used.

For introduction in culture have been used apical and lateral gemmae as initial explant.

On the basis of existing methods of introduced explants sterilization *in vitro* and various ways of their processing, we developed and used following methods. So, at the initial stage rose branches with gemmae were washed out by flowing water. The further processing was spent by solution with antimycotic agent “Fundazol” (0,01 g/l) addition in exposition 3 hours at constant stirring on magnetic mixer. The basic sterilization was spent in three ways. For aseptic essential oil rose material were used superficial processing by solutions of ethanol 70 %, hydrogen peroxide 20 % and «Domestos» solution in dilution 2:1 with distilled water.

At the first way the material was processed by ethanol 70 % 1 minute, then by washing-up liquid «Domestos» in dilution 3:1 with distilled water in an exposition of 5 minutes. At the second way processing 20 % perhydrol – 2 minutes, 70 % ethanol in exposition 1 minute and solution «Domestos» in dilution 2:1 with distilled water in exposition of 10 minutes. At the third way of processing was used a mix of 10 % perhydrol and 70 % ethanol in exposition of 5 minutes and solution «Domestos» in dilution 2:1 with distilled water in exposition of 15 minutes. After the basic sterilization explants were exposed to fivefold washing in sterile distilled water for removal of sterilizing substances.

Explants were cultivated on modified Murasige and Skuga (MS) growth mediums. Growth mediums have been added by growth regulators, in particular were used 6-furfurilaminopurin (kinetin), indoleacetic acid and gibberellin acid. Growth mediums were exposed to autoclaving pending 20 minutes at pressure in the sterilizing chamber 1-1,2 atm. In 21 day the analysis of essential oil rose explants viability and contamination was carried out.

As a result of explants sterilization it is possible to draw a conclusion, that the second way of sterilization provided the greatest explants viability (on the average 82,3 %). In the first and third variant of sterilization at plants of all variety the percent of an exit sterile explants has averaged 18,3 % and 11,3 % accordingly. It is necessary to notice, that low viability at the third variant of sterilization is caused by aggression of sterilizing agents which oppressed their germinating ability. The further explants sterilization was spent by the second way.

The isolated essential oil rose plants tissues *in vitro* of variety Raduga, Lan, Lada in cultural room were at light exposure – 2,0-2,5 thousand Lk, the photoperiod – 16/8 h, temperature – 25-27°C and with relative air humidity – 50-60 %.

From a sterile vegetative material in laminar box by means of magnifier (× 5) and sterile tools set from aseptic plant gemmae were taken apexes with the size 0,5-2 mm.

Sterilized explants were placed on Murasige and Skuga agarinic modified growth medium, which was added with ascorbic acid as an antioxidant, and as growth regulators were used 6-furfurilaminopurin, indoleacetic acid and gibberellin acid. Ascorbic acid was used by us in concentration 25 mg/l for decreasing negative influence of phenols oxidation products on explants.

According to received data, essential oil rose meristematic explants establishment of variety Raduga on growth medium MS3 was more than in 2 times above, than on other variants of growth mediums. For roses of variety Lan the more productive has proved to be MS2 growth medium. Isolated rose meristems of variety Lada were regenerated on two growth mediums more actively: MS2 and MS4.

The perspectives of further researches of our laboratory is introduction in culture industrially valuable, used in perfumery essential oil plants, in particular lavenders angustifolia (*Lavandula angustifolia*) of variety Stepnaya, Rannaya and Sineva.

As a result of spent researches the most effective way of three-stage rose gemmae sterilization of variety Raduga, Lan and Lada, which consisted of 20 % H₂O₂ – 2 minutes, then 70 % ethanol – 1 minute and solution «Domestos» in dilution 2:1 in an exposition of 10 minutes has been allocated. The exit of sterile plants at the specified way of sterilization varied from 78 % to 86 %.

During research growth medium composition approbation has been spent for essential oil rose introduction of variety Raduga, Lan, Lada. It is revealed, that an optimum growth medium for essential oil rose of variety Raduga is MS3, of variety Lan – MS2 and of variety Lada – MS2 and MS4.

The carried out researches have shown, that clonal microreproduction is accompanied by plants improvement.

Key words: microcloning, explants sterilization, growth medium, essential oil rose of variety Raduga, essential oil rose of variety Lan, essential oil rose of variety Lada

ВВЕДЕНИЕ

Роза – одна из основных эфиромасличных культур, выращиваемая в АР Крым. Роза (*Rosa L.*) – род подсемейства розовые (*Rosaidea L.*) семейства Розоцветные (*Rosaceae L.*), который включает около 400 видов и более 25 тыс. сортов. В настоящее время собственником всех сортов розы эфиромасличной, внесенных в «Государственный реестр сортов растений Украины» является ИСХ Крыма. Авторами сортов Лань, Радуга и Лада являются Л.Г. Назаренко и Л.А. Грищенко.

На базе предприятия ООО «КРЫМАГРОСОЮЗ» в январе 2014 года начала работу лаборатория «Биотехнологии микрореклонального размножения», основной задачей которой является получение высококачественного, здорового посадочного материала свободного от вирусных, грибных и бактериальных заболеваний.

В данной работе предложен эффективный способ стерилизации почек эфиромасличной розы сортов Радуга, Лань и Лада при введении *in vitro*. Для введения в культуру растений эфиромасличной розы предложены модификации питательной среды Мурасиге и Скуга [1].

Клональное микроразмножение включает в себя несколько этапов: введение эксплантов в культуру, собственно микроразмножение, укоренение растений *in vitro* и адаптацию размножаемых растений к нестерильным условиям произрастания [2-4].

Следует отметить, что на размножение *in vitro* влияют генотип, возраст исходного растения, сезонность изоляции, а также размер исходного экспланта. Из гормональных факторов – соотношение цитокининов и ауксинов, состав питательной среды, а из физических – кислотность среды, условия освещения, а также температурный режим и относительная влажность воздуха. К физиологическим факторам относится время (сезон года) изоляции экспланта. Ткани и органы, изолированные в момент вегетации растений, обладают более высокой чувствительностью к составу питательной среды и способны с высокой частотой образовывать адвентивные почки, формировать побеги и укореняться, по сравнению с тканями, взятыми в качестве экспланта, в период глубокого и вынужденного покоя [4-6].

Целью данного исследования является подбор эффективных методов стерилизации вводимых в культуру эксплантов розы сортов Радуга, Лань и Лада, а также питательных сред для введения в культуру, что позволяет увеличить количество и ускорить получение эксплантов для дальнейшего микроразмножения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исходным материалом для исследования послужили растения эфиромасличной розы сортов – Радуга, Лань и Лада. Побеги были взяты для исследования в ноябре и привезены из АР

Крым, сохранялись в холодильной камере при температуре $+3-5^{\circ}$ во влажных тканях в герметичных контейнерах.

Подготовка лабораторной посуды, инструментов и приготовление питательных сред для работы производили по общепринятым методикам [1, 2]. Для культивирования эксплантов использовали пробирки 1,5x16 см с объемом питательной среды 10 мл и колбы Эрленмейера объемом 100 мл, которые содержали 20 мл питательной среды (рис. 1).

Для введения в культуру были использованы апикальные и латеральные почки в качестве исходного экспланта. На основе существующих методов стерилизации вводимых эксплантов *in vitro* и различных способов их обработки [3], нами были разработаны и использованы следующие методы. Так, на начальном этапе побеги роз с почками промывали проточной водой. Дальнейшую обработку проводили раствором с добавлением фунгицида «Фундазол» (0,01 г/л) в экспозиции 3 часа при постоянном помешивании на магнитной мешалке. Основную стерилизацию проводили тремя способами (табл. 1). Для получения асептического материала розы эфиромасличной использовали поверхностную обработку растворами этилового спирта 70%, перекиси водорода 20% и раствора «Доместос» в разведении 2:1 с дистиллированной водой.



Рис. 1. Микрклональное размножение розы эфиромасличной в пробирках и колбах Эрленмейера

При первом способе материал обрабатывали 70% этанолом 1 минуту, затем моющим средством «Доместос» в разведении 3:1 с дистиллированной водой в экспозиции 5 минут. При втором способе обработку осуществляли 20% пергидролем – 2 минуты, 70% этанолом в экспозиции 1 минуту и раствором «Доместос» в разведении 2:1 с дистиллированной водой в экспозиции 10 минут. При третьем способе обработки использовали смесь 10% пергидроля с 70% этанолом в экспозиции 5 минут и раствор «Доместос» в разведении 2:1 с дистиллированной водой в экспозиции 15 минут. После основной стерилизации экспланты подвергались пятикратной промывке в стерильной дистиллированной воде для удаления стерилизующих веществ.

Экспланты культивировали на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга (MS). Питательные среды были дополнены регуляторами роста, в частности использовали 6-фурфуриламинопурин (кинетин), индолилуксусную кислоту (ИУК) и гиббереллиновую кислоту (ГК). Питательные среды подвергались автоклавированию в течении 20 минут при давлении в стерилизационной камере 1-1,2 атм. На 21-е сутки проводился анализ жизнеспособности и инфицированности эксплантов эфиромасличной розы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При обработке первым способом стерилизации эксплантов наблюдался выход стерильных эксплантов эфиромасличной розы сорта Радуга – 21 шт. (18,3±3,6 % от всего количества простерилизованных эксплантов), сорта Лань – 21 шт. (21,2±4,1 % от всего количества простерилизованных эксплантов), сорта Лада – 17 шт. (16,0±3,5 % от всего количества простерилизованных эксплантов) (табл. 1).

При втором способе стерилизации выход стерильных эксплантов среди сортов эфиромасличной розы распределился следующим образом. Так, у сорта Радуга выход стерильных эксплантов составил 79 шт. (78,2±4,1 % от всего количества простерилизованных эксплантов), у сорта Лань – 83 шт. (85,6±3,5 % от всего количества простерилизованных эксплантов), у сорта Лада – 78 шт. (83,0±3,9 % от всего количества простерилизованных эксплантов) (табл. 1).

При третьем способе стерилизации были получены следующие результаты. У сорта Радуга выход стерильных эксплантов составил 14 шт. (12,6±3,1 % от всего количества простерилизованных эксплантов), у сорта Лань – 9 шт. (8,8±2,8 % от всего количества простерилизованных эксплантов), у сорта Лада – 12 шт. (12,2±3,3 % от всего количества простерилизованных эксплантов) (табл. 1).

Таким образом, в результате стерилизации эксплантов вышеперечисленными способами можно сделать вывод, что второй способ стерилизации обеспечивал наибольшую жизнеспособность эксплантов (в среднем 82,3 %). В первом и третьем варианте стерилизации у растений всех сортов процент выхода стерильных эксплантов составил в среднем 18,3 % и 11,3 % соответственно (табл. 1). Необходимо отметить, что низкая жизнеспособность при третьем варианте стерилизации обусловлена агрессивностью стерилизующих агентов, которые угнетали их проростание. Дальнейшая стерилизация эксплантов проводилась вторым способом.

Таблица 1 – Жизнеспособность эксплантов розы эфиромасличной при введении почек *in vitro* в зависимости от способа стерилизации

№ п/п	Способ стерилизации эксплантов	Сорт эфиромасличной розы	Количество простерилизованных эксплантов, шт	Выход стерильных эксплантов, шт.	Выход стерильных эксплантов, %
1.	- 70% этанол (1 мин); - р-р «Доместос» в разведении 3:1 (5 мин)	Радуга	115	21	18,3±3,6
		Лань	99	21	21,2±4,1
		Лада	106	17	16,0±3,5
2.	- 20% H ₂ O ₂ (2 мин); - 70% этанол (1 мин); - р-р «Доместос» в разведении 2:1 (10 мин)	Радуга	101	79	78,2±4,1
		Лань	97	83	85,6±3,5
		Лада	94	78	83,0±3,9
3.	- смесь 10% H ₂ O ₂ с 70% этанолом (5 мин); - р-р «Доместос» в разведении 2:1 (15 мин)	Радуга	111	14	12,6±3,1
		Лань	102	9	8,8±2,8
		Лада	98	12	12,2±3,3

Согласно литературных данных, первый этап клонального размножения включает в себя подбор растения-донора, введение *in vitro* и получение хорошо растущей стерильной культуры [6]. В культуральной комнате находились изолированные ткани *in vitro* растений эфиромасличной

розы сортов Радуга, Лань и Лада при освещенности – 2,0-2,5 тыс. лк., фотопериоде – 16/8 ч, температуре – 25-27° С и относительной влажности воздуха – 50-60% (рис. 2).

Из стерильного растительного материала в ламинарном боксе с помощью лупы (×5) и набора стерильных инструментов из асептических почек растений извлекали апексы размером 0,5-2 мм. Извлечение апексов проводилось с учетом того, что размер экспланта также является фактором, определяющим успех микроразмножения. Чем меньше эксплант, тем меньшей регенерационной способностью он обладает, но он менее жизнеспособен. С другой стороны, в клетках крупного экспланта увеличивается возможность появления патогенов, что препятствует оздоровлению размноженных в культуре тканей растений. Оптимальная величина экспланта зависит от видовых особенностей растения-донора и свойств органа, из которого изолирован эксплант.

Простерилизованные экспланты помещали на агаризованную модифицированную питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) дополненную аскорбиновой кислотой в качестве антиоксиданта, а в качестве регуляторов роста использовали 6-фурфуриламинопурин, индолилуксусную кислоту (ИУК) и гиббереллиновую кислоту [2, 4, 7].



Рис. 2. Культуральная комната

Аскорбиновая кислота нами использовалась в концентрации 25 мг/л с целью снижения негативного влияния продуктов окисления фенолов на экспланты [4,5].

Состав питательных сред, использованных для введения в культуру растений розы сортов Радуга, Лань и Лада *in vitro*, приведен в табл. 2.

Таблица 2 – Состав питательных сред по Мурасиге и Скугу для введения в культуру *in vitro* эфиромасличной розы

Модификация среды Мурасиге-Скуга	концентрация, мг/л				рН
	Аскорбиновая к-та, мг	Кинетин, мг	ИУК, мг	Гиббереллиновая кислота, мг	
MS 1	25,0	0,5	0,04	1,0	5,72
MS 2	25,0	1,0	0,04	1,0	5,77
MS 3	25,0	2,0	0,04	1,0	5,75
MS 4	25,0	1,0	0,2	1,0	5,80
MS 5	25,0	2,0	0,5	1,0	5,73

Согласно полученным данным (табл. 3) приживаемость меристемных эксплантов розы сорта Радуга на питательной среде MS3 была более чем в 2 раза выше, чем на остальных вариантах питательных сред. Для роз сорта Лань более продуктивной показала себя среда MS2. Изолированные меристемы роз сорта Лада активнее регенерировали на двух средах: MS2 и MS4 (рис. 3).

Таблица 3 – Длина побега растений эфиромасличной розы после второго способа стерилизации на 21-е сутки после помещения их на различные питательные среды

Модификация среды Мурасиге-Скуга	Длина побега, мм		
	Сорт эфиромасличной розы Радуга	Сорт эфиромасличной розы Лань	Сорт эфиромасличной розы Лада
MS1	2,03±0,11	3,96±0,24	4,59±0,38
MS2	4,02±0,12	16,00±0,51	14,01±0,58
MS3	11,86±0,84	5,06±0,28	6,02±0,27
MS4	4,08±0,24	6,96±0,33	16,00±0,55
MS5	7,00±0,21	6,01±0,33	6,01±0,46

Проведенные исследования также показали, что клональное микроразмножение сопровождается оздоровлением растений, так как небольшая часть растения – эксплант, применяемый для клонального размножения, подвергается стерилизации. Асептическое культивирование на стерильных питательных средах в условиях, исключающих инфицирование, оздоравливает полученные растения от нематод и бактериальных патогенов. Таким образом, можно предполагать, что в сочетании с термотерапией и химиотерапией метод клонального размножения позволит в значительной степени избавиться и от вирусов, виридов и микоплазм.



Рис. 3. Экспланты роз на 21-й день культивирования

Перспективами дальнейших исследований нашей лаборатории является введение в культуру промышленно ценных, используемых в парфюмерии эфиромасличных растений, в частности лаванды узколистной (*Lavandula angustifolia*) сортов Степная, Ранняя и Синева.

ВЫВОДЫ

1. В результате проведенных исследований был выделен наиболее эффективный способ трёхступенчатой стерилизации почек роз сортов Радуга, Лань и Лада, состоящий из стерилизации 20% H₂O₂ – 2 минуты, затем 70% этанолом – 1 минуту и раствором «Доместос» в разведении 2:1 в экспозиции 10 минут. Выход стерильных растений при указанном способе стерилизации варьировал от 78% до 86%.
2. В ходе исследования была проведена апробация составов питательных сред для введения в культуру эфиромасличных роз сортов Радуга, Лань и Лада. Выявлено, что оптимальной питательной средой для розы эфиромасличной сорта Радуга является среда MS3, для сорта Лань – среда MS2 и для сорта Лада – среды MS2 и MS4.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений / Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
3. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. – К.: Наукова думка, 1980. – 488 с.
4. Кушнір Г.П. Мікроклональне розмноження рослин / Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацька. – К.: Наукова думка, 2005. – 271 с.
5. Калинин Ф.Л. Технология микрклонального размножения растений / Ф.Л. Калинин, Г.П. Кушнір, В.В. Сарнацька. – К.: Наукова думка, 1992. – 232 с.
6. Пилунская О.А. Использование биотехнологических методов для размножения розы эфиромасличной / О.А. Пилунская, А.М. Бугара // Проблемы, достижения и перспективы развития медико-биологических наук и практического здравоохранения. Труды Крымского государственного медицинского университета. – 2001. – Т. 137. – С. 91-93.
7. Пилунская О.А. Введение в культуру *in vitro* розы эфиромасличной / О.А. Пилунская // Научные труды Крымского государственного аграрного университета. – 1999. – Вып. 58. – С. 88-97.
8. Высоцкий В.А. Клональное микроразмножение растений / В.А. Высоцкий // Культура клеток растений и биотехнология. – М.: Наука, 1986. – С. 285.

REFERENCES

1. Butenko R.G. Kultura izolirovannyh tkaney I fiziologiya morfogeneza rasteniy / R.G. Butenko. – M.: Nauka, 1964. – 272 s.
2. Kalinin F.L. Metody kultury tkaney v fiziologii I biohimii rasteniy / F.L. Kalinin, V.V. Sarnatskaya, V.E. Polischuk. – K.: Naukova dumka, 1980. – 488 s.
3. Kushnir G.P. Mikroklonalne rozmnozheniya roslin / G.P. Kushnir, V.V. Sarnatskaya. – K.: Naukova dumka, 2005. – 271 s.
4. Kalinin F.L. Tehnologiya mikronalnogo rozmnozheniya rasteniy / F.L. Kalinin, G.P. Kushnir, V.V. Sarnatskaya. – K.: Naukova dumka, 1992. – 232 s.
5. Pilunskaya O.A. Isrolzovaniye biotehnologicheskikh metodov dlya rozmnozheniya rozy efiromaslichnoy / O.A. Pilunskaya, A.M. Bugara // Problemy, dostizheniya i perspektivy razvitiya mediko-biologicheskikh nauk i prakticheskogo zdravooohraneniya. Trudy Krymskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta. – 2001. – T. 137. – S. 91-93.
6. Pilunskaya O.A. Vvedeniye v kulturu *in vitro* rozy efiromaslichnoy / O.A. Pilunskaya // Nauchnyye trudy Krymskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – 1999. – Vyp. 58. – S. 88-97.
7. Vysotskiy V.A. Klonalnoye mikrorazmnozheniye rasteniy / V.A. Vysotskiy // V kn.: Kultura kletok rasteniy i biotehnologiya. – M.: Nauka, 1986. – S. 285.