Раздел 3
СЕЛЕКЦИЯ, СЕМЕНОВОДСТВО И БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 631.523:634.1:635.9 DOI: 10.31360/2225-3068-2024-89-141-152
EDN ZGRUII

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА НА МОРФОГЕНЕЗ *HELLEBORUS CAUCASICUS* A. BR. В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Маляровская В.И., Цатурян Г.А.

Федеральный исследовательский центр «Субтропический научный центр Российской академии наук»», г. Сочи, Россия, e-mail: malyarovskaya@yandex.ru

Маляровская В.И. orcid.org/0000-0003-4213-8705
Цатурян Г.А. orcid.org/0000-0002-6277-1105

Helleborus caucasicus A. Br. редкий вид природной флоры Западного Кавказа, который включён в Красную книгу Краснодарского края. Для сохранения и размножения морозника кавказского использован биотехнологический метод (культура клеток и тканей). Целью наших исследований являлось изучение действия стерилизующих веществ на жизнеспособность семян и влияния регуляторов роста на морфогенные процессы *Helleborus caucasicus* A. Br. В результате исследований нами отработан этап введения в культуру *in vitro* эксплантов (семян) *H. caucasicus.* Определён оптимальный состав стерилизующих веществ и их экспозиций (спирт этиловый 96 % – 1 мин и белизна 10 % – 10 мин), при котором выход стерильных эксплантов составил 100 %. Установлено, что добавление в питательную среду различных типов и концентраций цитокининов и ауксинов стимулировало скорость и процент прорастания семян. Однако частота регенерации варьировала от 37,3 ±5,4 % (в контроле) до 86,8 ±9,4 %. Высокая регенерация отмечена также на среде с содержанием 6-Бап-1,0 мг/л, ИМК-0,1 мг/л, $ГК_3$-0,5 мг/л (63,1 ±6,9 %). Вместе с тем наиболее эффективной для получения высокого процента регенерации (86,8 ±9,4 %) и наименее короткого периода прорастания (105 дней) оказалась среда с повышенным содержанием регуляторов роста 6-Бап-3 мг/л, ИМК-0,5 мг/л, $ГК_3$-1,5 мг/л. Протокол, разрабатываемый в настоящем исследовании, может быть использован для длительного сохранения и размножения в условиях *in vitro* редкого вида *H. caucasicus,* с последующей реинтродукцией растений в естественные места произрастания.

Ключевые слова: *Helleborus caucasicus*, стерилизующие вещества, культура *in vitro*, регуляторы роста, морфометрические показатели, процент жизнеспособности.

Введение. *Helleborus* L. – небольшой род семейства Ranunculaceae, включающий по данным Long L. и соавторов (2023) около 19 видов [17], по информации Plant List всего 13 видов [19]. Все виды, принадлежащие к роду *Helleborus* декоративны, к тому же корни и листья этих растений содержат биологически активные вещества, используемые в фармакологии [14, 21]. Вместе с тем многие виды морозника, включая и редкий вид природной флоры Западного Кавказа *Helleborus caucasicus* A. Br. занесены в Красные книги [4, 16]. В связи с этим многими исследователями предложены различные биотехнологические приёмы размножения представителей рода *Helleborus* в условиях *in vitro* [9, 11, 16]. Однако в известных нам литературных источниках содержится относительно немного сведений о микроклональном размножении различных видов морозников, ещё меньше сведений о виде *Helleborus caucasicus* A. Br. По мнению некоторых авторов успех введения в культуру *in vitro* во многом зависит от выбора эксплантa, эффективности стерилизации, подбора питательных сред, регуляторов роста и т. д. [5, 6, 12, 23].

Много мнений существует на тот счёт, как преодолеть трудности при стерилизации эксплантов, однако, для разных культур предлагают различные способы стерилизации. Это и ступенчатая стерилизация с обработкой различных типов эксплантов поочерёдно несколькими стерилизующими веществами в разных концентрациях, и применение антибиотиков. Так, M. Seyring (2002) отмечает, что при введении в стерильные условия корневищ морозника, часто наблюдается высокая контаминация [22]. Растительные ткани объекта могут служить серьёзным источником заражения, так как, на их поверхности присутствуют различные бактерии и вирусы. Поэтому, поверхностная стерилизация эксплантов растений от наружной инфекции является очень важным этапом при введении их в стерильные условия. Есть мнение, что длина растительных побегов при этом должна составлять не более 2–3 см [3]. Успех введения в культуру *in vitro,* во многом определяется концентрацией и составом стерилизующих веществ, а также, типом растительного эксплантa. Чем нежнее растительные экспланты, тем меньше должна быть концентрация стерилизующего вещества, чтобы сохранить их жизнеспособность. Известно, что эндогенное заражение исходных эксплантов бывает намного сильнее, чем поверхностное [1, 7]. При стерилизации некоторые авторы предлагают использовать двухступенчатую обработку, при которой экспланты сначала выдерживают в течение 2 с' в 70%-ном этиловом спирте, а потом в течение 15 мин в 0,1–0,2%-ном растворе сулемы. При таком способе стерилизации были получены хорошо растущие культуры, способные в дальнейшем к образованию почек и развитию меристем. Однако, L.K. Caesar (2015) считает, что вы-

сокоэффективной стерилизации побегов морозника можно достичь при использовании других стерилизующих веществ: гипохлорита натрия (NaClO), перекиси водорода (H_2O_2) в концентрации 3 % и 0,5 % раствора сулемы ($HgCl_2$) [13]. О.А. Чурикова (2015) отмечает успех введения в культуру *in vitro* недозревших семян с использованием ещё не вскрывшихся плодов-листовок *H. caucasicus* A. Br и *H. purpurascens* предстерилизационной обработки их фундазолом, 70%-ным этиловым спиртом 1–2 мин и 3%-ным раствором лизоформина 12–15 мин [11]. Получение стерильной культуры *in vitro* несомненно является основой и необходимым условием для этапа микроклонального размножения растений.

Также важное значение имеет состав компонентов питательных сред, которые обеспечивают микропобеги необходимыми веществами для нормального роста и развития [13]. Для многих видов растений, в том числе и для видов морозника, оптимальной является питательная среда по прописи Murashige и Skoog (MC) (1962) [18]. Эта среда отличается большим содержанием неорганических веществ, витаминов и их концентраций, которые стимулируют процессы органогенеза и соматического эмбриогенеза [8].

Так, E. Gabryszewska (2017) в своей работе предложила на этапе введения в культуру и микроразмножения морозника *H. purpurascens* использовать среду Мурасиге и Скуга с содержанием регуляторов роста 6-бензиламинопурин (БАП) 1,0 мг/л, 2-изопентиладенином (2-iP) 1,0 мг/л, что эффективно стимулировало морфогенные процессы и спонтанную укореняемость при пониженной температуре (+15 °С) [16]. В то же время, О.А. Чурикова (2015), для размножения *H. caucasicus* и *H. purpurascens* использовала питательную среду, состоящую из 1/2 МС, витаминов и с добавлением довольно высокой концентрации цитокинина 6-бензиламинопурин в концентрации 5 мг/л [11]. Другие исследователи, E. Dhooghe с соавторами (2007), изучая морфогенные процессы при размножении пазушными почками четырёх видов *Helleborus*: *H. argutifolius*, *H. foetidus*, *H. niger и H. orientalis* применяли питательную среду на основе МС с добавлением 2-изопентиладенина (2-iP) и 6-бензиламинопурина, при этом по их данным коэффициент размножения в большей степени зависел от генотипа растения и варьировал от 1,3 для *H. foetidus* до 3,8 для *H. niger,* чем от регуляторов роста [15]. R. Poupet с соавторами (2006) проводили размножение *H. niger* на среде МС с добавлением 8,9 мкМ 6-бензиламинопурина, коэффициент размножения микропобегов в их опыте варьировал от 2 до 3,4 шт./эксплант в течение 24 месяцев [20]. В тоже время M. Seyring (2002) на этапе введения в условия *in vitro* культивировал верхушечные побеги *H. niger* на U-среде с добавлением 8,9 мкМ/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 2,7 мкМ /л нафталинуксусной кислоты, а эффективное размножение отмечено им на U-среде с добавлением 2,2 мкМ /л БАП и 2,9 мкМ/л гиббереллиновой кислоты [21].

В связи с вышесказанным ***целью наших исследований*** было изучение действия стерилизующих веществ на жизнеспособность семян и влияния регуляторов роста на морфогененные процессы *Helleborus caucasicus* A. Br.

Объекты и методы исследований. Исследования выполняли в отделе биотехнологии ФИЦ СНЦ РАН (2021–2023 гг.). Объектом исследований служили семена *H. caucasicus*. Сбор семян осуществляли в сроки их созревания, в период с середины мая по первую декаду июня, на территории отдела ботанического сада «Дерево Дружбы». В работе использовали методы клонального микроразмножения, основанные на общепринятых классических приёмах работы с культурами изолированных тканей и органов растений [2]. Для поверхностной стерилизации эксплантов в качестве стерилизующих агентов были использованы 96%-ный раствор этанола (C_2H_6O), 10%-ный H_2O_2, 5–20%-ный раствор гипохлорита натрия (NaClO «Sigma», США), доместос, мультидез в различном составе и времени экспозиции: в качестве контроля использовали обработку растительного материала 96%-ным раствором этилового спирта;

1 – вариант 10%-ный H_2O_2 15 мин, 25%-ный мультидез 25 мин;

2 – вариант 96%-ный C_2H_6O 1 мин, мультидез 25%-ный 15 мин;

3 – вариант вариант 96%-ый C_2H_6O 1 мин, 100%-ый доместос 5 мин

4 – вариант 96%-ный C_2H_6O 1 мин, 100%-ный доместос 10 мин;

5 – вариант 96%-ный C_2H_6O 1 мин, 100%-ный белизна 5 мин;

6 – вариант 96%-ный C_2H_6O 1 мин, 100%-ный белизна 10 мин;

7 – вариант 96%-ный C_2H_6O 1 мин, 100%-ный белизна 20 мин;

8 – вариант 96%-ный C_2H_6O 1 мин, 100%-ный белизна 5 мин, 5%-ный мультидез 5 мин.

Стерилизацию семян проводили в несколько этапов: вначале ополаскивали в мыльном растворе, затем промывали в водопроводной и дистиллированной воде.

Для регуляции процессов индукции морфогенеза в питательную среду по прописи Мурасиге-Скуга (МС) вводили регуляторы роста растений: 6-бензиламинопурин (БАП), индолил-3-масляную кислоту (ИМК, «Sigma», США) гиббереллиновую кислоту (Гк) в различных концентрациях и сочетаниях: контроль (без регуляторов роста); БАП-5,0 мг/л, ИМК-1,0 мг/л, Гк-2,5 мг/л; БАП-3,0 мг/л, ИМК-0,1 мг/л, Гк-1,5 мг/л; БАП-1,0 мг/л, ИМК-0,5 мг/л, $ГК_3$-0,5 мг/л.

Пробирки с эксплантами содержали в культуральной комнате с 16/8-часовым фотопериодом, интенсивностью освещения 2 клк при температуре 22 ±1 °С. Жизнеспособность семян учитывали как процентное соотношение стерильных эксплантов к общему количеству,

введённых в стерильную культуру. Математическая обработка данных проведена стандартными методами с использованием пакета программ Microsoft Office Excel 2007.

Результаты и их обсуждение. Этап введения в культуру – это важный этап технологии клонального микроразмножения. В это время от инфекции, которая находится на эксплантах, может погибнуть значительная часть исходного материала. Для поверхностного обеззараживания растительных тканей применяют различные стерилизующие вещества. Поверхностная стерилизация освобождает эксплант от наружной инфекции.

В наших исследованиях наилучшие результаты стерилизации (100 %) *H. caucasicus* получены в варианте с этиловым спиртом и 100%-ной белизной в экспозиции 10 мин, различия между вариантами существенны (рис. 1).

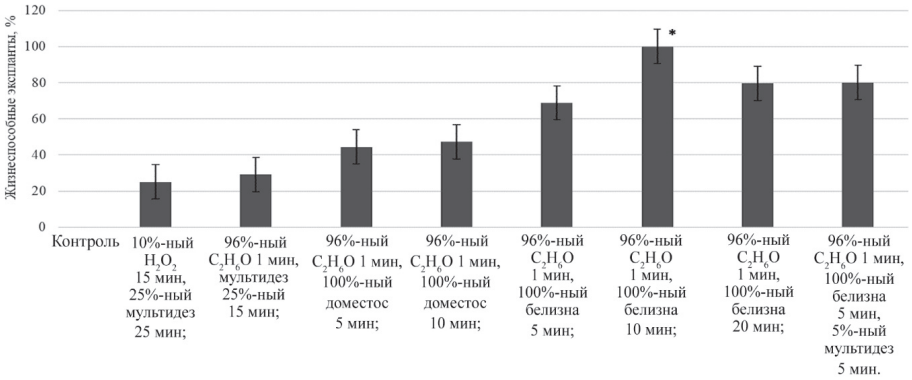

Рис. 1. Влияние состава стерилизующих веществ
и их экспозиций на выход жизнеспособных эксплантов *H. caucasicus*
*Примечание: *– вариант, в котором есть существенная разница p < 0,05.*

Fig. 1. Effect of the composition of sterilizing agents
and their exposures on the yield of viable explants of *H. caucasicus*
*Note: * – variant in which there is a significant difference p < 0.05.*

Также эффективны для стерилизации эксплантов оказались варианты с использованием этилового спирта и 100%-ной белизны в экспозиции 20 мин, и этилового спирта, белизны, в сочетании с мультидезом в экспозиции 5 мин, жизнеспособность стерильных эксплантов в этих вариантах составила около 80 %. Стерилизация перекисью водорода в сочетании с мультидезом в течение 15 и 25 минут оказала негативное влияние на экспланты морозника кавказского, жизнеспособность эксплантов была в пределе 25 %. Основную часть составляла скрытая инфекция, которая проявлялась через 5–7 дней культивирования. В контрольном варианте (обработка 96%-ным этиловым спиртом 1 мин) стерилизации все экспланты были инфицированы.

Прорастание семени морозника начинается с появления главного корня, затем происходит разрастание гипокотиля (рис. 2).

Эксперименты показали, что испытанные нами регуляторы роста оказывали различное влияние на индукцию и активацию эксплантов, которое наблюдали в течение первого пассажа (рис. 3).

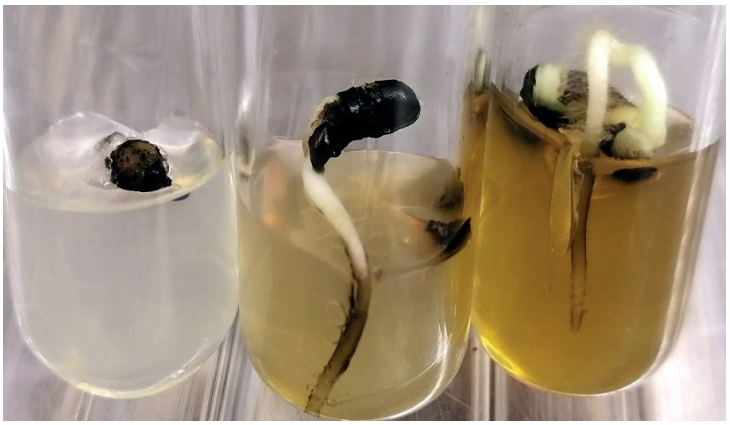

Рис. 2. Прорастающие семена *H. caucasicus* на среде МС в условиях *in vitro*
Fig. 2. Germinating seeds of *H. caucasicus* on MS medium under *in vitro* conditions

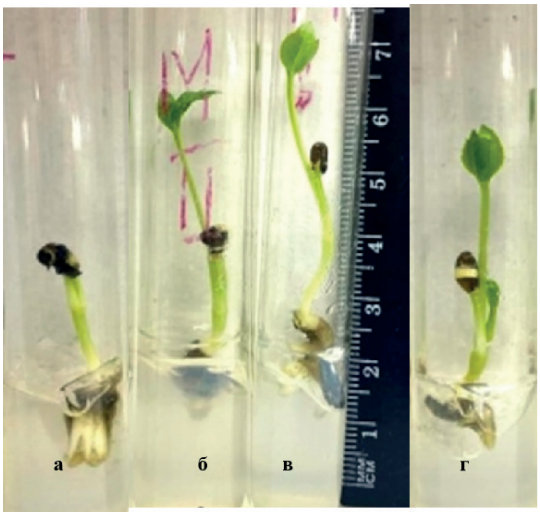

Рис. 3. Влияние концентраций регуляторов роста на развитие растений *H. caucasicus:* **а** – контроль (без регуляторов роста); **б** – БАП 5,0 мг/л, ИМК 1,0 мг/л, Гк 2,5 мг/л; **в** – БАП-3,0 мг/л, ИМК-0,1 мг/л, Гк-1,5 мг/л; **г** – БАП-1,0 мг/л, ИМК-0,5 мг/л, $ГК_3$-0,5 мг/л

Fig. 3. Effect of growth regulator concentrations on the development of *H. caucasicus* plants: **a** – control (without growth regulators); **b** – BAP 5.0 mg/l, IMC 1.0 mg/l, Gk 2.5 mg/l; **c** – BAP-3.0 mg/l, IMC-0.1 mg/l, Gk-1.5 mg/l; **d** – BAP-1.0 mg/l, IMC-0.5 mg/l, GK_3-0.5 mg/l

Выявлены различия в морфометрических показателях эксплантов *H. caucasicus* в зависимости от концентрации регуляторов роста в питательной среде (рис. 4). Анализ данных по изучению влияния комбинаций регуляторов роста на индукцию морфогенеза показал, что наиболее эффективной для роста и развития побегов оказалась питательная среда с содержанием 6 БАП-3,0 мг/л, ИМК-0,5 мг/л и $ГК_3$-1,5 мг/л (рис. 4). При повышении концентрации этих регуляторов роста длина побегов *H. caucasicus* уменьшалась на 1,9 см, различия между вариантами существенны. Наши результаты не согласуются с данными других авторов, у которых лучшие результаты были получены при высокой концентрации 6-БАП-5 мг/л [11]. Наименее эффективным для роста микропобегов морозника был вариант с пониженным содержанием регуляторов роста и контроль (без регуляторов роста).

При последующей адаптации растений-регенерантов к нестерильным условиям важно учитывать и другие морфологические показатели: длину и количество корней. В целом все экспериментальные среды (кроме контроля) для индукции органогенеза оказывали положительное влияние на морфологию растений-регенерантов (рис. 4, 5). Вместе с тем, наиболее длинные корни 3,9 ±1,2 см, отмечены на среде с содержанием 6 БАП-3,0 мг/л, ИМК-0,5 мг/л и Гк-1,5 мг/л, чем на среде с повышенным содержанием этих же регуляторов роста 2,7 ±0,9 см, однако различия между вариантами несущественны. Минимальная длина корней наблюдалась в контроле и составила 1,8 ±0,2 см.

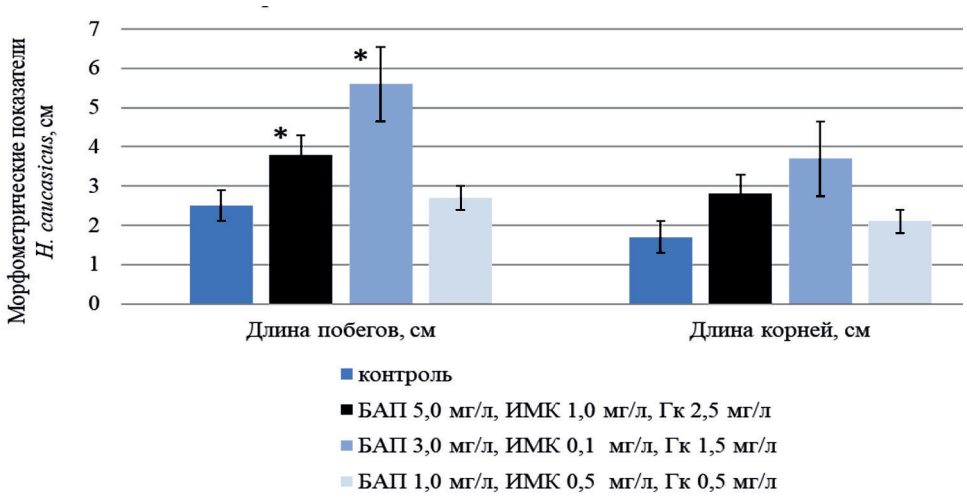

Рис. 4. Влияние регуляторов роста на длину побегов и корней *H. caucasicus*
Fig. 4. Effect of growth regulators on shoot and root length of *H. caucasicus*

Максимальное количество корней (4,7 ±0,7 шт./эксплант) отмечено на том же варианте, что и длина корней, различия между вариантами существенны. В тоже время различия по морфометрическому показателю «количество корней» между вариантами питательных сред, содержащих разные концентрации изучаемых регуляторов роста, составило 1,5–2 шт./эксплант. Наименьшее количество корней (1,4 ±0,3шт./эксплант) формировалось на среде без регуляторов роста (контроль).

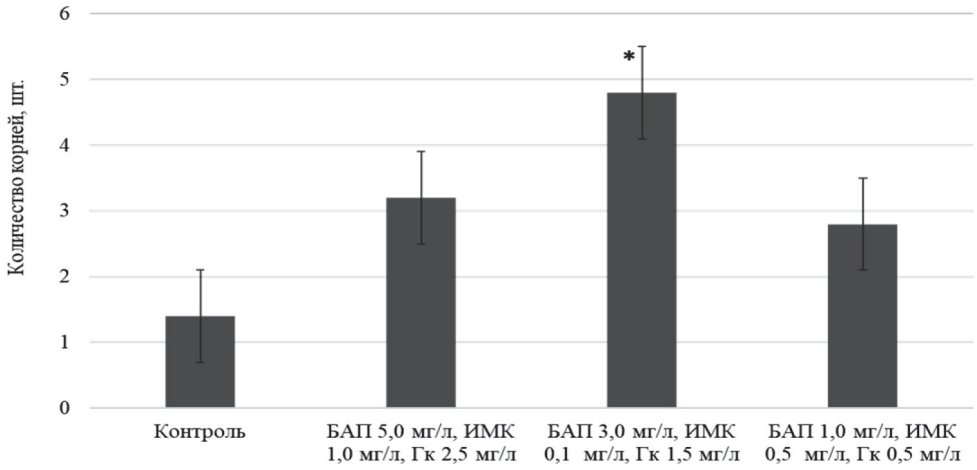

Рис. 5. Влияние регуляторов роста на количество корней *H. caucasicus*
Fig. 5. Effect of growth regulators on the number of roots of *H. caucasicus*

В результате эксперимента также установлено, что добавление в питательную среду различных типов и концентраций цитокининов и ауксинов стимулировало скорость и процент прорастания семян. Однако, частота регенерации варьировала от 37,3 ±5,4 % (в контроле) до 86,8 ±9,4 % (рис. 6). Высокая регенерация отмечена на среде с содержанием 6-Бап-1,0 мг/л, ИМК-0,1 мг/л, $ГК_3$ -0,5мг/л (63,1 ±6,9 %). Вместе с тем наиболее эффективной для получения высокого процента регенерации (86,8 ±9,4 %) и наименее короткого периода прорастания (105 дней) оказалась среда с повышенным содержанием регуляторов роста 6-Бап-3мг/л, ИМК-0,5 мг/л, $ГК_3$-1,5 мг/л (рис. 7). Среда без регуляторов роста и с низкими их концентрациями не способствовали активной регенерации растений.

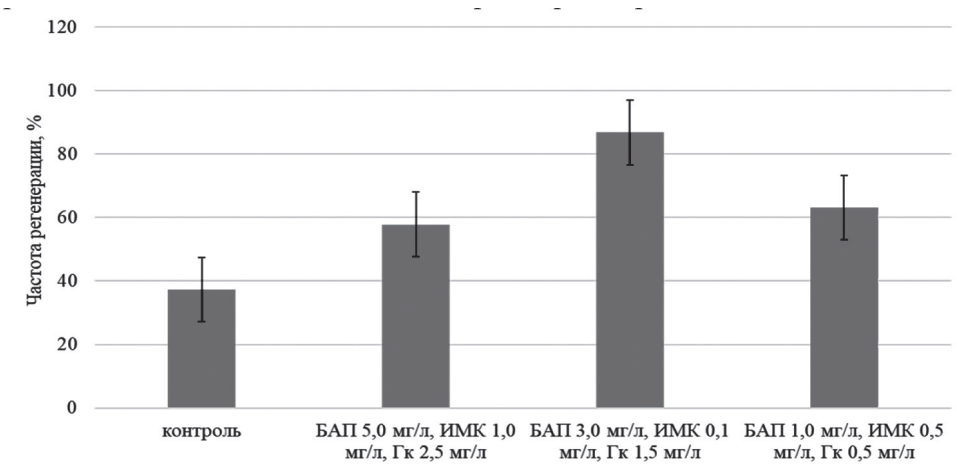

Рис. 6. Процент прорастания семян *H. Caucasicus*
в зависимости от концентрации регуляторов роста в питательной среде

Fig. 6. Percentage of germination of *H. caucasicus* seeds depending
on the concentration of growth regulators in the nutrient medium

Рис. 7. Растения *H. caucasicus*
через 4 месяца культивирования в условиях *in vitro:*
а – на питательной среде с БАП-3,0 мг/л, ИМК-0,1 мг/л, $ГК_3$-1,5 мг/л;
б – БАП-5,0 мг/л, ИМК-1,0 мг/л, $ГК_3$-2,5 мг/л

Fig. 7. *H. caucasicus* plants after 4 months of *in vitro* cultivation:
a – On nutrient medium with BAP-3.0 mg/L, IMC-0.1 mg/L, GK_3-1.5 mg/L;
b – BAP-5.0 mg/L, IMC-1.0 mg/L, GK_3-2.5 mg/L

Выводы. Таким образом, в процессе исследований нами разработаны приёмы получения асептической культуры эксплантов *H. caucasicus*. Определён оптимальный состав стерилизующих веществ и их экспозиций (спирт этиловый 96 % 1 мин и белизна 10 % 10 мин), при котором выход стерильных эксплантов составил 100 %. Установлены особенности морфогенных процессов эксплантов в условиях *in vitro* и подобраны оптимальные концентрации и типы регуляторов роста в питательной среде для этапов индукции морфогенеза.

Выявлено, что добавление в питательную среду различных типов и концентраций цитокининов и ауксинов стимулировало скорость и процент прорастания семян. Вместе с тем наиболее эффективной для получения высокого процента регенерации (86,8 ±9,4 %) и наименее короткого периода прорастания (105 дней) оказалась среда с повышенным содержанием регуляторов роста 6-Бап-3 мг/л, ИМК-0,5 мг/л, $ГК_3$ -1,5 мг/л.

Протокол, разрабатываемый в настоящем исследовании, может быть использован для длительного сохранения и размножения в условиях *in vitro* редкого вида *H. caucasicus,* с последующей реинтродукцией растений в естественные места произрастания.

Публикация подготовлена в рамках реализации ГЗ ФИЦ СНЦ РАН FGRW-2024-0003, регистрационный номер рег. № 1022040700985-0-4.1.1;4.1.5

Список литературы/References

1. Беседина Е.Н. Усовершенствование метода клонального микроразмножения подвоев яблони *in vitro*. Автореф. канд. дис. Краснодар: КубГАУ, 2015. [Besedina E.N. Improvement of the method of clonal micropropagation of apple-tree rootstocks *in vitro.* Abstract of the cand. Thesis. Krasnodar: KubSAU, 2015. (In Rus)].
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999; 158. [Butenko R.G. Biology of higher plant cells *in vitro* and biotechnology on their basis. M.: FBC-PRESS, 1999; 158. (In Rus)].
3. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. М.: издательский центр «Академия», 2003, 208. [Egorova T.A., Klunova S.M., Zhivukhina E.A. Fundamentals of Biotechnology. M.: Academy Publishing Centre, 200; 208. (In Rus)]. ISBN: 978-6697-4.
4. Красная книга Краснодарского края: Растения и грибы. отв. ред. С.А. Литвинская. Краснодар: Дизайн Бюро, 2017; 850. [Krasnodar Krai Red Book: Plants and fungi. ed. by S.A. Litvinskaya. Krasnodar: Design Bureau, 2017; 850. (In Rus)]. ISBN: 978-5-9-91111-006-2
5. Маляровская В.И. Особенности получения стерильной культуры камелии японской (*Camelia japonica* L.), Субтропическое и декоративное садоводство. 2012; 47 : 161-167. [Malyarovskaya V.I. Peculiarities of obtaining sterile culture of camellia japonica (*Camelia japonica* L.), Subtropical and ornamental horticulture. 2012; 47 : 161-167. (In Rus)].
6. Маляровская В.И., Шуркина Е.С. Влияние факторов культивирования на длительность депонирования *in vitro* эндемичного вида *Campanula sclerophylla* Kolak.,

Субтропическое и декоративное садоводство. 2022; 81 : 98-106. [Malyarovskaya V.I., Shurkina E.S. Influence of cultivation factors on the duration of in vitro deposition of the endemic species *Campanula sclerophylla* Kolak., Subtropical and ornamental horticulture. 2022; 8 : 98-106. (In Rus)]. DOI: 10.313602225-3068-2022-81-98-106.
7. Самарина Л.С., Маляровская В.И., Рогожина Е.В., Малюкова Л.С. Эндофитные микроорганизмы, как промоутеры роста растений в культуре *in vitro,* Сельскохозяйственная биология. 2017; 52(5) : 917-927. [Samarina L.S., Malyarovskaya V.I., Rogozhina E.V., Malyukova L.C. Endophytic microorganisms as promoters of plant growth *in vitro* culture, Agricultural biology. 2017; 52(5) : 917-927. (In Rus)]. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.5.917rus.
8. Собралиева Э.А., Палаева Д.О., Батукаев М.С., Батукаев А.А. Состояние изученности микроклонального размножения плодово-ягодных культур и винограда: Инновационная деятельность как фактор развития агропромышленного комплекса в современных условиях: матер. межд. науч. конф., Грозный, 2020; 100-118. [Sobralieva E.A., Palaeva D.O., Batukayev M.S., Batukayev A.A. State of study of microclonal propagation of fruit and berry crops and grapes: Innovative activity as a factor of development of agroindustrial complex in modern conditions: mater. International Scientific Conference, Grozny, 2020; 100-118. (In Rus)]. DOI: 10.36684/22-2020-1-100-118.
9. Цатурян Г.А., Маляровская В.И. *Helleborus caucasicus* A. Br.: Биологические особенности и методы его сохранения, Субтропическое и декоративное садоводство. 2022; 83 : 133-145. [Tsaturyan G.A., Maliarovskaya V.I. *Helleborus caucasicus* A. Br.: Biological features and methods of its conservation, Subtropical and ornamental horticulture. 2022; 83 : 133-145. (In Rus)]. DOI: 10.31360/2225-3068-2022-83-133-144.
10. Цатурян Г.А., Маляровская В.И. Изучение разнообразия видов *Helleborus* L. с помощью молекулярно-генетических методов (литобзор), Субтропическое и декоративное садоводство. 2023; 85 : 82-99. [Tsaturyan G.A., Malyarovskaya V.I. Study of *Helleborus* L. species diversity using molecular-genetic methods (litho review), Subtropical and ornamental horticulture. 2023; 85 : 82-99. (In Rus)]. DOI: 10.31360/2225-3068-2023-84-155-168.
11. Чурикова О.А. Разработка основ введения в культуру *in vitro* и микроклонального размножения видов морозника, Вестник современной науки. 2015; 4 : 30-33. [Churikova O.A. Development of bases for *in vitro* introduction and microclonal propagation of frost species, Vestnik sovremennoi nauki. 2015; 4 : 30-33. (In Rus)].
12. Шхалахова Р.М., Маляровская В.И., Конинская Н.Г., Киселева Н.С. Особенности размножения *Osmunda regalis* L. методами биотехнологии, Субтропическое и декоративное садоводство. 2022; 82 : 103-114. [Shkhalakhova R.M., Malyarovskaya V.I., Koninskaya N.G., Kiseleva N.S. Features of reproduction of *Osmunda regalis* L. by biotechnology methods, Subtropical and ornamental horticulture. 2022; 82 :103-114. (In Rus)]. DOI: 10.31360/2225-3068-2022-82-103-114.
13. Caesar L., Adelberg J. Using a multifactor approach for improving stage responses of *Helleborus* hybrids in micropropagation, Propagation of Ornamental Plants. 2015; 15(4) : 125-135.
14. Cuny E. Bioactive Ingredients of *Helleborus niger* L. (Christmas Rose): The Renaissance of an Old Medicinal Herb-A Review, Natural Product Communications. 2023; 18(9). DOI: 10.1177/1934578X231201053.
15. Dhooghe E., Christine M., Labeke V. *In vitro* propagation of *Helleborus* species, Plant Cell Tiss Organ Cult. 2007; 9 : 175-177. DOI: 10.1007/s11240-007-9280.
16. Gabryszewska E. Propagation *in vitro* of *Hellebores* (*Helleborus* L.) review, Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus. 2017; 16(1) : 61-72.
17. Long L., Yamada K., Ochiai M.A Comprehensive review of the morphological and molecular taxonomy of the genus *Helleborus* (Ranunculaceae), Reviews in Agricultural Science. 2023; 11 : 106-120. DOI: 10.7831/ras.11.0_106.

18. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures, Physiologia Plantarum. 1962; 15 : 473-497.
19. WFO Plant List. 2021. URL: https://wfoplantlist.org/taxon/wfo-4000017279-2021-12?page=1 (The link is active on: 10.04.2024).
20. Poupet R., Cardin L., Henri A., Onesto J.P. Healthy *in vitro* propagation by meristem tip culture of *Helleborus niger* selected clone for cut flower, Acta Hortic. 2006; 725 : 301-310. DOI: 10.17660/ActaHortic.2006.725.37.
21. Segneanu A.-E., Vlase G., Vlase T. et al. Wild-Grown Romanian *Helleborus purpurascens* Approach to Novel Chitosan Phyto-Nanocarriers - Metabolite Profile and Antioxidant Properties, Plants. 2023; 12(19) : 3479. DOI: 10.3390/plants12193479.
22. Seyring M. *In vitro* cloning of *Helleborus niger,* Plant Cell Rep. 2002; 20 : 895-900. DOI: 10.1007/s00299-001-0420-1.
23. Withers L.A. *In vitro* collecting-concept and background, *in vitro* collecting techniques for germplasm conservation. Rome, 2002; 6-2. ISBN: 9290435348.

STUDY OF THE EFFECT OF GROWTH REGULATORS ON *HELLEBORUS CAUCASICUS* A. BR. MORPHOGENESIS *IN VITRO*

Malyarovskaya V.I., Tsaturyan G.A.

Federal Research Centre
the Subtropical Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences,
Sochi, Russia, e-mail: malyarovskaya@yandex.ru

Helleborus caucasicus A. Br. is a rare species of the natural flora of the Western Caucasus, which is included in the Red Book of the Krasnodar Territory. A biotechnological method (cell and tissue culture) was used to preserve and reproduce the Caucasian hellebore. The purpose of our research was to study the effect of sterilizing agents on the viability of seeds and the effect of growth regulators on the morphogenic processes in *Helleborus caucasicus* A. Br. As a result of our research, we have worked out the stage of introducing *H. caucasicus* explants (seeds) into culture *in vitro.* The optimal composition of sterilizing agents and their exposures (ethyl alcohol 96 % – 1 min and whiteness 10 % – 10 min) was determined, at which the yield of sterile explants was 100 %. It was found that the addition of various types and concentrations of cytokinins and auxins to the nutrient medium stimulated the rate and percentage of seed germination. However, the regeneration rate varied from 37.3 ±5.4 % (in the control) to 86.8 ±9.4 %. High regeneration was also noted on media containing 6-Bap-1.0 mg/l, BMI-0.1 mg/l, GC3-0.5 mg/l (63.1 ±6.9 %). At the same time, the most effective medium for obtaining a high percentage of regeneration (86.8 ±9.4 %) and the least short germination period (105 days) was the one with an increased content of growth regulators 6-Bap-3mg/l, BMI-0.5 mg/l, GC_3-1.5mg/l. The protocol developed in this study can be used for long-term preservation and reproduction of a rare species of *H. caucasicus in vitro*, followed by the reintroduction of plants into natural habitats.

Key words: *Helleborus caucasicus*, sterilising agents, *in vitro* culture, growth regulators, morphometric parameters, viability percentage.