

УДК 581.143.6:582.594.2

Светлана Михайловна Ленивко¹, Артур Сергеевич Карунос²¹канд. биол. наук, доц., доц. каф. зоологии и генетики

Брестского государственного университета имени А. С. Пушкина

²магистрант 2-го года обучения факультета естествознания

Брестского государственного университета имени А. С. Пушкина

Svetlana Lenivko¹, Artur Karunos²¹Candidate of Biological Sciences, Associate Professor,
Associate Professor of the Department of Zoology and Genetics
of Brest State A. S. Pushkin University²2-nd Year Master's Student of the Faculty of Natural Sciences
of Brest State A. S. Pushkin Universitye-mail: zoology@brsu.brest.by

ИНДУКЦИЯ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА У РАЗЛИЧНЫХ ЭКСПЛАНТОВ ФАЛЕНОПСИСА ГИБРИДНОГО

Проведена оценка индукции прямого соматического эмбриогенеза в тканях листа и корня *Phalaenopsis hybridum hort.* в различных вариантах гормональной регуляции. Установлено, что синтетический регулятор роста тидиазурон с цитокинин-ауксиновым типом действия проявляет большую эффективность в формировании соматических эмбриоидов, чем совместное действие цитокинина и ауксина. Выявлено, что фрагменты корней сеянцев *in vitro* фаленопсиса гибридного, по сравнению с листовыми эксплантатами имеют больший морфогенный отклик по частоте прямого соматического эмбриогенеза в различных вариантах гормональной регуляции.

Ключевые слова: соматический эмбриогенез, тидиазурон, 6-бензиламинопурин, индол-3-масляная кислота, листовые и корневые экспланты, *Phalaenopsis hybridum hort.*

Induction of Somatic Embryogenesis in Various of Phalaenopsis Hybrid of the Explants

The induction of direct somatic embryogenesis in leaf and root tissues of *Phalaenopsis hybridum hort* was assessed. in various variants of hormonal regulation. It has been established that the synthetic growth regulator thidiazuron with a cytokinin-auxin type of action is more effective in the formation of somatic embryoids than the combined action of cytokinin and auxin. It was revealed that fragments of roots of *Phalaenopsis hybridum hort* seedlings *in vitro* in comparison with leaf explants, have a greater morphogenic response in terms of frequencies of direct somatic embryogenesis in various variants of hormonal regulation.

Key words: somatic embryogenesis, thidiazuron, 6-benzylaminopurine, indole-3-butyric acid, leaf and root explants, *Phalaenopsis hybridum hort.*

Введение

Соматический эмбриогенез – процесс, при котором соматические (незиготические) клетки формируют зародышеподобные структуры, которые, проходя через характерные стадии эмбрионального развития, формируют новые растения, – не теряет своей перспективности и требует проведения дальнейших исследований. Многие виды растений хранят в себе потенциальную способность к соматическому эмбриогенезу, однако для образования соматических эмбриоидов (СЭ) необходимы специфические условия *in vitro*. Развитие соматических зародышей орхидных проходит через формирование цилиндрической эмбриональной структуры с апикальной меристемой, из которой, образуется протокормоподобное тело, а в дальнейшем – проросток [1]. Процесс соматического эмбриогенеза можно разделить на две фазы: первую, где клетки приобретают эмбрионную компетенцию и в такой конституции пролиферируют, и вторую, на протяжении которой пролиферирующие клетки дифференцируются в соматические зародыши. Путь прямого соматического эмбриогенеза (ПСЭ), не связанный с образованием каллуса, яв-

ляется более востребованным при разработке технологий получения селекционно-ценного растительного материала. Основными индукторами дифференциации СЭ и дальнейшей регенерации растений из них являются специфически необходимые регуляторы роста растений [2].

Основываясь на доступной нам литературе, можно отметить, что на успешную индукцию ПСЭ у представителей семейства *Orchidaceae* Juss. влияют такие регуляторы роста, как цитокинины 6-бензиламинопурин (БА), 2-изопентениладенин и цитокининоподобное соединение тидиазурон (ТДЗ) [3–7]. Для индукции ПСЭ рекомендуется применять БА в концентрации от 0,5 до 20 мг/л [8–11], а рекомендуемые концентрации ТДЗ находятся в диапазоне от 0,25 до 3,0 мг/л [12, 13]. В экспериментальных работах по индукции ПСЭ также практикуется использование комбинации цитокининов и ауксинов, причем наиболее часто применяется ауксин НУК (нафтилуксусная кислота), концентрация которого варьирует в пределах от 0,1 до 1 мг/л [14]. В целом ауксины в культуре *in vitro* необходимы для стимулирования образования и пролиферации протокормоподобных тел, однако ингибируют их конверсию в проростки [15]. Положительное влияние на ПСЭ оказывает и модифицирование питательных сред посредством введения органических компонентов, таких как мальтоза, глутамин, пептон, дрожжевой экстракт, картофельный или банановый экстракт, березовый или томатный сок, эндосперм кокоса [16–18]. Перспективность разработки вопросов, связанных с гормональной индукцией соматического эмбриогенеза, связана с возможностью создания эффективной системы регенерации растений в условиях *in vitro*.

Цель исследования – оценить индукцию ПСЭ в тканях листа и корня фаленопсиса гибридного в различных вариантах гормональной регуляции.

Материал и методы исследования

Объектами исследований явились два типа зрелых эксплантов: листья трех порядков (апикальный, срединный и базальный) и фрагменты корней (апикальный, срединный и базальный) из ювенильных растений асептических сеянцев *Phalaenopsis hybridum* hort., которые к моменту экспериментов имели по три листа и 2–3 корня. Выбор объектов исследования был определен имеющимся в литературе данными о способности их тканей индуцировать протокормоподобные тела [19], а также доступностью в большом количестве для проведения экспериментальных работ и возможностью изолирования без существенного нарушения развития исходного материала.

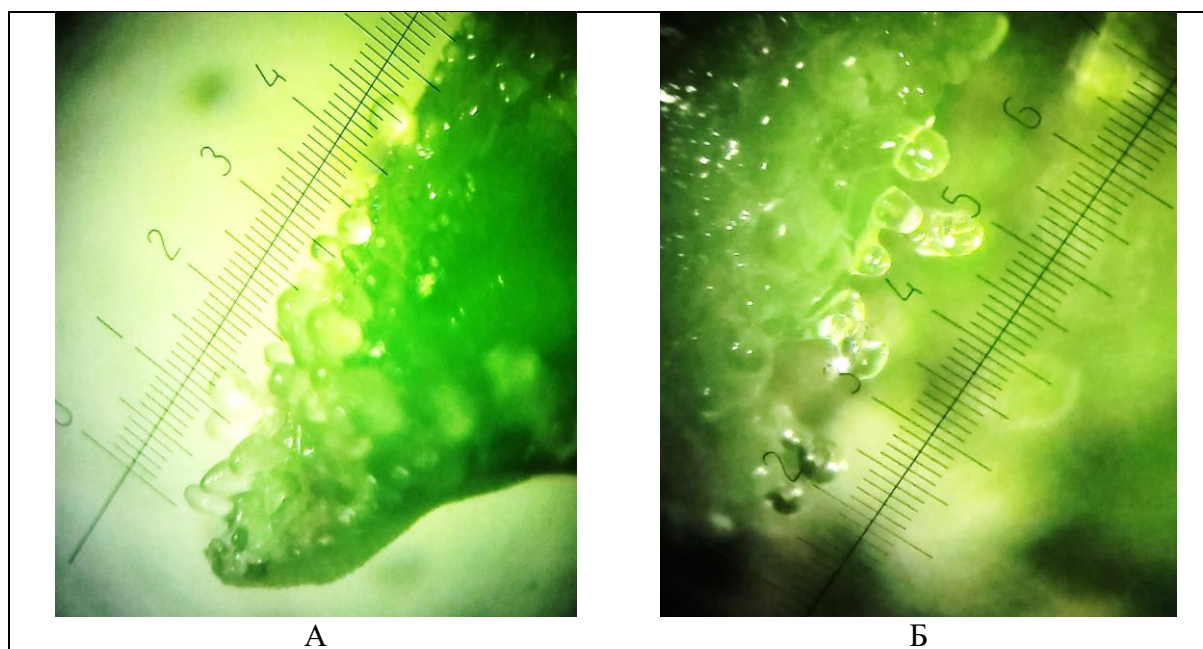
Эксперимент проводился в три этапа. На первом этапе варианты опыта различались различным содержанием тидиазурина (ТДЗ): 0,5, 1, 2 и 3 мг/л. На втором этапе варианты питательных сред были дополнены фитогормонами 6-бензиламинопурином (БА), индолил-3-масляной кислотой (ИМК) и ТДЗ в следующих концентрациях (мг/л): 0,5 БА + 0,01 ИМК (1-й вариант); 0,5 БА + 0,1 ИМК (2-й вариант); 1,5 ТДЗ (3-й вариант); 0,5 БА (4-й вариант); 0,1 БА + 0,01 ИМК (5-й вариант). За основу была взята среда Мурасиге и Скуга, содержащая макро- и микроэлементы в половинной концентрации.

Индукция морфогенетических процессов, приводящих к ПСЭ, осуществлялась в камере для роста растений KBW 400 при 16-ти часовом фотопериоде с интенсивностью освещения 3000 лк и постоянной температуре + 19 °С. Морфогенетическая реакция эксплантов фиксировалась с помощью бинокулярного микроскопа МБС-10.

Статистическую обработку полученных результатов проводили согласно общепринятым методам биологической статистики с использованием программы Excel. Достоверность значимости различий между вариантами эксперимента определяли по t-критерию Стьюдента. Дисперсионный анализ применяли для комплексной оценки полученных средних значений по вариантам опыта, установления значимости и доли влияния факторов на их изменчивость.

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе исследований решалась задача по определению оптимальной концентрации ТДЗ для индукции ПСЭ на эксплантах *Phalaenopsis hybridum hort.* Первые СЭ были отмечены на 20-е сутки эксперимента на апикальных листовых эксплантах и на трансверсальных срезах базальных фрагментов корней (рисунок 1).



А – на листовых пластинках; Б – на фрагментах корней

Рисунок 1 – Первичные СЭ на эксплантах *Phalaenopsis hybridum hort.*

Минимальные частоты ПСЭ листовых эксплантов были зафиксированы на базальных фрагментах листовых эксплантов и апикальных фрагментах корней на питательной среде с ТДЗ в концентрации 0,5 мг/л и составили 20,0 % и 32,0 % соответственно на 30-е сутки эксперимента. На 60-е сутки эксперимента указанные экспланты также сохранили самую низкую отзывчивость к условиям культивирования.

Таблица 1 – Частота формирования первичных СЭ под влиянием различных концентраций ТДЗ у эксплантов *Phalaenopsis hybridum hort.*, %

Тип экспланта	Концентрация ТДЗ, мг/л				Время
	0,5	1	2	3	
Апикальный лист	37,0 ± 12,5	46,0 ± 12,9	54,0 ± 12,9	57,0 ± 12,8	30-е сутки
	44,0 ± 11,4	62,0 ± 12,5*	74,0 ± 11,3*	83,0 ± 9,7*	60-е сутки
Средний лист	30,0 ± 11,8	41,0 ± 12,7	47,0 ± 12,9	49,0 ± 12,9	30-е сутки
	42,0 ± 12,7	57,0 ± 12,8	68,0 ± 12,0	79,0 ± 10,5*	60-е сутки
Базальный лист	20,0 ± 10,3	32,0 ± 12,0	35,0 ± 12,3	45,0 ± 12,8	30-е сутки
	30,0 ± 11,8	43,0 ± 12,8	56,0 ± 12,8	59,0 ± 12,7	60-е сутки
Апикальный фрагмент корня	32,0 ± 12,0	43,0 ± 12,8	49,0 ± 12,9	53,3 ± 12,9	30-е сутки
	43,0 ± 12,8	59,0 ± 12,7	71,0 ± 11,7	77,0 ± 10,9*	60-е сутки
Средний фрагмент корня	40,0 ± 12,6	49,0 ± 12,9	57,0 ± 12,8	62,0 ± 12,5	30-е сутки
	50,0 ± 12,9	67,0 ± 12,1	79,0 ± 10,5*	85,0 ± 9,2*	60-е сутки
Базальный фрагмент корня	40,0 ± 12,6	61,0 ± 12,7	65,0 ± 12,3	64,0 ± 12,4	30-е сутки
	60,0 ± 12,5	78,0 ± 10,7	84,0 ± 9,5*	92,0 ± 7,0*	60-е сутки

Примечание – * – достоверно по сравнению с концентрацией 0,5 мг/л при $P \leq 0,05$.

Частоты ответной морфогенетической реакции в виде формирования первичных СЭ на срезах тканей апикальных листьев были существенно выше во всех вариантах опыта по сравнению с ТДЗ в концентрации 0,5 мг/л на 60-е сутки. При этом наиболее высокие показатели на 30-е и 60-е сутки культивирования зарегистрированы при культивировании апикальных листьев в двух вариантах опыта: 54,0 и 74,0 % соответственно на среде с ТДЗ в концентрации 2 мг/л, 57,0 и 83,0 % на среде с ТДЗ в концентрации 3 мг/л. Частота ПСЭ на средних листьях была существенно выше в варианте опыта с ТДЗ в концентрации 3 мг/л на 60-е сутки культивирования по сравнению с ТДЗ в концентрации 0,5 мг/л и составляла 79,0 %. Базальные листья, используемые в качестве эксплантов, существенно не различались по частоте морфогенетического отклика на испытанные концентрации ТДЗ.

Частота ПСЭ на апикальных фрагментах корней была значительно выше на 60-е сутки в варианте опыта с ТДЗ в концентрации 3 мг/л (по сравнению с ТДЗ в концентрации 0,5 мг/л) на 34 %. Высоким оказался регистрируемый показатель и в варианте опыта с ТДЗ в концентрации 2 мг/л (71,0 %), однако статистически его достоверность не была установлена. Морфогенетическая активность средних фрагментов корней оказалась существенной при содержании в питательной среде ТДЗ в количестве 2 и 3 мг/л на 60-е сутки. Так частота зафиксированной морфогенетической реакции была на уровне 85,0 % в варианте опыта с ТДЗ в концентрации 3 мг/л и 79,0 % в варианте опыта с ТДЗ в концентрации 2 мг/л по сравнению с ТДЗ в концентрации 0,5 мг/л. Аналогичная реакция на 60-е сутки культивирования наблюдалась у базальных фрагментов корней фаленопсиса с максимумом частоты ПСЭ 92,0 % в варианте опыта с ТДЗ в концентрации 3 мг/л и 84,0 % в варианте опыта с ТДЗ в концентрации 2 мг/л.

Таким образом, нами установлено, что из трех типов листовых эксплантов наиболее отзывчивым на условия культивирования оказался апикальный лист. Из трех типов корневых эксплантов наиболее выраженный ПСЭ был отмечен у базальных фрагментов. Для статистического выяснения закономерностей изменчивости формирования СЭ под влиянием ТДЗ у *Phalaenopsis hybridum* hort. в системе «концентрация – тип экспланта» проведен двухфакторный дисперсионный анализ, по результатам которого была рассчитана доля влияния фактора, представленная в таблице 2.

Таблица 2 – Доля влияния фактора в изменчивости частоты ПСЭ у *Phalaenopsis hybridum* hort., %

Источник вариации	Листовые экспланты		Корневые экспланты	
	30-е сутки	60-е сутки	30-е сутки	60-е сутки
Тип экспланта	38,3	26,6	22,0	11,4
Концентрация ТДЗ	59,9	72,2	74,0	86,6
Случайные отклонения	1,8	1,2	4,0	1,9

Дисперсионный анализ подтвердил наличие достоверных различий по частоте формирования СЭ у *Phalaenopsis hybridum* hort. как типа экспланта, так и концентрации ТДЗ, причем последний фактор оказался определяющим в индукции ПСЭ. Так, доля влияния фактора «концентрации ТДЗ» в варьировании данного показателя оказалась более 50 % при культивировании листовых и корневых эксплантов на протяжении всего эксперимента.

На втором этапе проводимых исследований решалась задача по оценке интенсивности морфогенного отклика на эксплантах *Phalaenopsis hybridum* hort. различного морфо-анатомического генезиса по частоте ПСЭ, индуцируемого различными экзогенными синтетическими морфорегуляторами. Эксперимент был проведен для расширения

спектра эффективных регуляторов роста в отношении ПСЭ у зрелых эксплантов фаленопсиса гибридного.

Частота формирования СЭ в различных вариантах гормональной регуляции у двух типов зрелых эксплантов *Phalaenopsis hybridum hort.* на 30-е сутки эксперимента представлена в таблице 3.

Таблица 3 – Частота формирования СЭ (%) в различных вариантах гормональной регуляции у эксплантов *Phalaenopsis hybridum hort.*

Тип экспланта	Варианты эксперимента				
	1	2	3	4	5
	0,5 БА + 0,01 ИМК	0,5 БА + 0,1 ИМК	1,5 ТДЗ	0,5 БА	0,1 БА + 0,01 ИМК
Апикальный лист	55,6 ± 11,7	52,4 ± 10,9	42,0 ± 11,3	0	47,4 ± 11,5 ^a
Средний лист	41,7 ± 10,1	47,6 ± 10,9	50,0 ± 11,2	4,2 ± 4,1 ^{b*}	37,5 ± 12,1
Базальный лист	0	34,8 ± 9,9 ^b	52,4 ± 10,9	16,7 ± 7,6 ^{b*}	40,9 ± 10,5
Апикальный фрагмент корня	30,6 ± 7,7	40,0 ± 8,9 ^b	40,0 ± 8,9 ^a	20,6 ± 6,9	13,6 ± 7,3 ^b
Средний фрагмент корня	35,3 ± 11,6*	68,4 ± 10,7*	40,0 ± 9,8	40,9 ± 10,5 ^a	21,0 ± 7,1*
Базальный фрагмент корня	50,0 ± 10,7	77,8 ± 8,0 ^{a*}	73,9 ± 9,2 ^{b*}	27,8 ± 10,6*	36,4 ± 10,3

Примечание – ^{a,b} – типы эксплантов, между которыми установлены достоверные различия при $P \leq 0,05$ в пределах варианта эксперимента; * – достоверно по сравнению с вариантами эксперимента при $P \leq 0,05$ в пределах одного типа экспланта.

Показатели частоты ПСЭ в 1-м варианте эксперимента варьировали от 30,6 % у апикального фрагмента корня до 55,6 % у апикального листа, при этом формирование эмбриоидов не было отмечено у базального листа. Существенной разницы между типами эксплантов по показателям ПСЭ не наблюдалось.

Во 2-м варианте эксперимента частота ПСЭ варьировала от 34,8 % у базального листа до 77,8 % у базального фрагмента корня. Установлена статистически значимая разница только между максимальным значением частоты формирования эмбриоидов у базального фрагмента корня и двумя типами эксплантов: апикальным фрагментом корня (40,0 %) и базальным листом (34,8 %).

В 3-м варианте эксперимента существенных различий по регистрируемому показателю в пределах листовых эксплантов не установлено, по-видимому, из-за небольшой вариации средних значений: от 42,0 % у апикального листа до 52,4 % у базального листа. В пределах корневых эксплантов существенно различались частоты ПСЭ у апикального (40,0 %) и базального (73,9 %) фрагментов корней.

Наибольшая изменчивость полученных данных наблюдалась в 4-м варианте эксперимента. Так, частота ПСЭ варьировала от 4,2 % у среднего листа до 40,9 % у среднего фрагмента корня, а у апикального листа формирование СЭ не было отмечено. Существенная разница частот ПСЭ была зафиксирована между максимальным значением частоты формирования эмбриоидов у среднего фрагмента корня и двумя типами эксплантов: базальным (16,7 %) и средним листом (4,2 %).

В 5-м варианте эксперимента было отмечена существенная разница между эксплантами, представленными апикальным листом с наибольшей частотой формирования эмбриоидов (47,4 %) и апикальным фрагментом корня, у которого зафиксировано наименьшее значение частоты (13,6 %).

Проведенный двухфакторный дисперсионный анализ подтвердил наличие достоверного влияния на частоту формирования СЭ у *Phalaenopsis hybridum* hort. только варианта питательной среды. Так, доля влияния гормональной регуляции в варьировании данного показателя составила 43,8 %.

Таким образом, подтверждена эффективность ТДЗ в концентрации 1,5 мг/л, а также установлена результативность совместного влияния БА в концентрации 0,5 мг/л и ИМК в концентрации 0,1 мг/л на формирование СЭ на испытанных типах эксплантов фаленопсиса гибридного.

Заклучение

В ходе первого этапа исследования выявлено усиление морфогенетической активности при повышении концентрации ТДЗ – синтетического регулятора с цитокинино-ауксиновым типом действия – с 0,5 до 3 мг/л, при этом значительно более высокий морфогенный отклик зафиксирован под влиянием ТДЗ в концентрациях 2 и 3 мг/л. Обнаружено, что отзывчивость на испытанные концентрации ТДЗ снижалась во всех вариантах опыта у листовых эксплантов в ряду «апикальный лист > средний лист > базальный лист», а частота ПСЭ у корневых эксплантов уменьшалась в трех вариантах опыта в ряду «базальный фрагмент > средний фрагмент > апикальный фрагмент». Наибольшие значения частот ПСЭ наблюдались под влиянием ТДЗ в концентрации 3 мг/л на базальном (92,0 %), среднем (85,0 %) фрагментах корня и апикальном листе (83,0 %), а также под влиянием ТДЗ в концентрации 2 мг/л на базальном фрагменте корня (84,0 %). Проведенный дисперсионный анализ полученных результатов позволил установить достоверное влияние на частоту ПСЭ у фаленопсиса гибридного как концентрации ТДЗ, так и типа экспланта. При этом доля влияния фактора «концентрация» возрастала, а фактора «тип экспланта» снижалась с 30-х к 60-м суткам эксперимента. Второй этап исследования показал, что наибольшие значения частот ПСЭ наблюдались под влиянием сочетания гормонов БА в концентрации 0,5 мг/л и ИМК в концентрации 0,1 мг/л на среднем (68,4 %) и базальном (77,8 %) фрагментах корня и под влиянием ТДЗ в концентрации 1,5 мг/л на базальном фрагменте корня (73,9 %). Дисперсионный анализ подтвердил существенную роль гормональной регуляции в индукции ПСЭ.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что синтетический регулятор роста ТДЗ с цитокинин-ауксиновым типом действия проявляет большую эффективность в формировании СЭ, чем совместное действие цитокинина и ауксина, а фрагменты корней сеянцев *in vitro* фаленопсиса гибридного имеют больший морфогенный отклик по частоте ПСЭ в различных вариантах гормональной регуляции. Представленные результаты могут послужить основой для разработки эффективной системы масштабного производства востребованных на рынке цветов растений *Phalaenopsis hybridum* hort. из зрелых эксплантов в Республике Беларусь, а также могут быть использованы для моделирования условий результативной мультипликации путем ПСЭ *in vitro* уникальных автохтонных видов семейства Орхидных.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee, Y. I. Orchid protocorm-like bodies are somatic embryos / Y. I. Lee, S. T. Hsu, E. C. Yeung // Am. J. Bot. – 2013. – Vol. 100. – P. 2121–2131.
2. Митрофанова, И. В. Соматический эмбриогенез как система *in vitro* размножения культурных растений / И. В. Митрофанова // Физиология и биохимия культуры растений. – 2009. – Т. 41, № 6. – С. 496–508.

3. Somatic embryogenesis from stem thin cell layers of *Dendrobium aqueum* Lindl. / S. Parthibhan [et al.] // *Biologia Plantarum*. – 2018. – Vol. 62. – P. 439–450.
4. Zanello, C. A. PLBs induction and clonal plantlet regeneration from leaf segment of commercial hybrids of *Phalaenopsis* / C. A. Zanello, J. C. Cardoso // *The J. of Horticultural Science and Biotechnology*. – 2019. – Vol. 94. – P. 627–631.
5. Indução e histologia de embriões somáticos primários e secundários do híbrido *Phalaenopsis* Classic Spotted Pink (Orchidaceae) / C. Ulisses [et al.] // *Acta biol. Colomb.* – 2016. – Vol. 21. – P. 571–578.
6. Chen, Y. Effects of thidiazuron and N6-benzylaminopurine on shoot regeneration of *Phalaenopsis* / Y. Chen, C. Piluek // *Plant Growth Regul.* – 1995. – Vol. 16. – P. 99–101.
7. Chen, Y. C. A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis* / Y. C. Chen, C. Chang, W. C. Chang // *In vitro cell. dev. biol.* – 2000. – Vol. 36. – P. 420–423.
8. Ernst, R. Effects of thidiazuron on in vitro propagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* (Orchidaceae) / R. Ernst // *Plant Cell Tiss. and Org. Cult.* – 1994. – Vol. 39. – P. 273–275.
9. The influence of thidiazuron on direct somatic embryo formation from various types of explant in *Phalaenopsis amabilis* L. ‘Blume’ orchid / W. Mose [et al.] // *HAYATI J. of Biosciences*. – 1992. – Vol. 24. – P. 201–205.
10. Gow, W. Enhancement of direct somatic embryogenesis and plantlet growth from leaf explants of *Phalaenopsis* by adjusting culture period and explant length / W. Gow, J. Chen, W. Chang // *Acta Physiol. Plant.* – 2010. – Vol. 32. – P. 621–627.
11. Duan, J. X. In vitro propagation of *Phalaenopsis* via culture of cytokinins-induced nodes / J. X. Duan, H. Chen, S. J. Yazawa // *Plant Growth Regul.* – 1996. – Vol. 15. – P. 133–137.
12. Efficient in vitro culture protocols for propagating *Phalaenopsis* ‘Cool Breeze’ / K. Balilashaki [et al.] // *Plant Tiss. Cult. and Biotechnology*. – 1992. – Vol. 24. – P. 191–203.
13. Chen, J. T. Direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Oncidium* ‘Gower Ramsey’ and subsequent plant regeneration / J. T. Chen, C. Chang, W. C. Chang // *Plant Cell Rep.* – 1999. – Vol. 19. – P. 143–149.
14. Chen, J. T. Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Oncidium* ‘Gower Ramsey’ / J. T. Chen, W. C. Chang // *Plant Growth Regul.* – 2001. – Vol. 34. – P. 229–232.
15. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis* / Y. Ishii [et al.] // *Plant Cell Rep.* – 1998. – Vol. 17. – P. 446–450.
16. Micropropagation of *Phalaenopsis* ‘R11 x R10’ through somatic embryogenesis method / F. Antensari [et. al.] // *Asian J. of Applied Sciences*. – 2014. – Vol. 2. – P. 145–150.
17. Islam, M. O. Effects of sucrose, maltose and sorbitol on callus growth of *Phalaenopsis*, *Doritaenopsis* and *Neofinetia* / M. O. Islam, S. Ichihashi // *J. Japan Soc. Hortic. Sci.* – 1999. – Vol. 68. – P. 1124–1131.
18. Tokuhara, K. Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of *Phalaenopsis* (Orchidaceae) / K. Tokuhara, M. Mii // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* – 2001. – Vol. 37. – P. 457–461.
19. *Phalaenopsis* LEAFY COTYLEDON1-induced somatic embryonic structures are morphologically distinct from protocorm-like bodies / J. C. Chen [et. al.] // *Frontiers in Plant Science*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1594.

REFERENCES

1. Lee, Y. I. Orchid protocorm-like bodies are somatic embryos / Y. I. Lee, S. T. Hsu, E. C. Yeung // *Am. J. Bot.* – 2013. – Vol. 100. – P. 2121–2131.

2. Mitrofanova, I. V. Somatic embryogenesis in vitro rozmnozhenija kul'turnykh rastenij / I. V. Mitrofanova // Fiziologija i biokhimiya kul'tury rastenij. – 2009. – T. 41, № 6. – P. 496–508.
3. Somatic embryogenesis from stem thin cell layers of *Dendrobium aqueum* Lindl. / S. Parthibhan [et al.] // Biologia Plantarum. – 2018. – Vol. 62. – P. 439–450.
4. Zanello, C. A. PLBs induction and clonal plantlet regeneration from leaf segment of commercial hybrids of *Phalaenopsis* / C. A. Zanello, J. C. Cardoso // The J. of Horticultural Science and Biotechnology. – 2019. – Vol. 94. – P. 627–631.
5. Indução e histologia de embriões somáticos primários e secundários do híbrido *Phalaenopsis* Classic Spotted Pink (Orchidaceae) / C. Ulisses [et al.] // Acta biol. Colomb. – 2016. – Vol. 21. – P. 571–578.
6. Chen, Y. Effects of thidiazuron and N6-benzylaminopurine on shoot regeneration of *Phalaenopsis* / Y. Chen, C. Piluek // Plant Growth Regul. – 1995. – Vol. 16. – P. 99–101.
7. Chen, Y. C. A reliable protocol for plant regeneration from callus culture of *Phalaenopsis* / Y. C. Chen, C. Chang, W. C. Chang // In vitro cell. dev. biol. – 2000. – Vol. 36. – P. 420–423.
8. Ernst, R. Effects of thidiazuron on in vitro propagation of *Phalaenopsis* and *Doritaenopsis* (Orchidaceae) / R. Ernst // Plant Cell Tiss. and Org. Cult. – 1994. – Vol. 39. – P. 273–275.
9. The influence of thidiazuron on direct somatic embryo formation from various types of explant in *Phalaenopsis amabilis* L. 'Blume' orchid / W. Mose [et al.] // HAYATI J. of Biosciences. – 1992. – Vol. 24. – P. 201–205.
10. Gow, W. Enhancement of direct somatic embryogenesis and plantlet growth from leaf explants of *Phalaenopsis* by adjusting culture period and explant length / W. Gow, J. Chen, W. Chang // Acta Physiol. Plant. – 2010. – Vol. 32. – P. 621–627.
11. Duan, J. X. In vitro propagation of *Phalaenopsis* via culture of cytokinins-induced nodes / J. X. Duan, H. Chen, S. J. Yazawa // Plant Growth Regul. – 1996. – Vol. 15. – P. 133–137.
12. Efficient in vitro culture protocols for propagating *Phalaenopsis* 'Cool Breeze' / K. Balilashaki [et al.] // Plant Tiss. Cult. and Biotechnology. – 1992. – Vol. 24. – P. 191–203.
13. Chen, J. T. Direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Oncidium* 'Gower Ramsey' and subsequent plant regeneration / J. T. Chen, C. Chang, W. C. Chang // Plant Cell Rep. – 1999. – Vol. 19. – P. 143–149.
14. Chen, J. T. Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis from leaf explants of *Oncidium* 'Gower Ramsey' / J. T. Chen, W. C. Chang // Plant Growth Regul. – 2001. – Vol. 34. – P. 229–232.
15. Callus induction and somatic embryogenesis of *Phalaenopsis* / Y. Ishii [et al.] // Plant Cell Rep. – 1998. – Vol. 17. – P. 446–450.
16. Micropropagation of *Phalaenopsis* 'R11 x R10' through somatic embryogenesis method / F. Antensari [et. al.] // Asian J. of Applied Sciences. – 2014. – Vol. 2. – P. 145–150.
17. Islam, M. O. Effects of sucrose, maltose and sorbitol on callus growth of *Phalaenopsis*, *Doritaenopsis* and *Neofinetia* / M. O. Islam, S. Ichihashi // J. Japan Soc. Hortic. Sci. – 1999. – Vol. 68. – P. 1124–1131.
18. Tokuhara, K. Induction of embryogenic callus and cell suspension culture from shoot tips excised from flower stalk buds of *Phalaenopsis* (Orchidaceae) / K. Tokuhara, M. Mii // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 2001. – Vol. 37. – P. 457–461.
19. *Phalaenopsis* LEAFY COTYLEDON1-induced somatic embryonic structures are morphologically distinct from protocorm-like bodies / J. C. Chen [et. al.] // Frontiers in Plant Science. – 2019. – Vol. 10. – P. 1594.