

**ФГБОУ ВО НОВОСИБИРСКИЙ ГАУ**

Агрономический факультет

Кафедра селекции, генетики и лесоводства

**ОСНОВЫ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ**

Методические указания  
для практических занятий и самостоятельной работы

Новосибирск 2015

Кафедра селекции, генетики и лесоводства

Составитель: *канд. с.-х. наук* И.В. Кондратьева

Рецензент: *д-р. биол. наук, проф.* М.Л. Кочнева

Основы сельскохозяйственной биотехнологии: метод. указания для практических занятий и самостоятельной работы / Новосиб. гос. аграр. ун-т. Агроном. фак-т; сост. И.В. Кондратьева – Новосибирск, 2015. – 65 с.

Методические указания предназначены для студентов очной и заочной формы обучения по направлению подготовки 35.03.04 Агрономия.

Утверждены и рекомендованы к изданию учебно-методическим советом агрономического факультета (протокол № 13 от 25.12. 2015 г.).

© ФГБОУ ВО НОВОСИБИРСКИЙ ГАУ, 2015

## 1. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ ДИСЦИПЛИНЫ

Цель дисциплины – сформировать научное мировоззрение о современных развивающихся направлениях биотехнологии, основанных на совокупности методов, использующих живые организмы и биологические процессы для улучшения свойств растений, используемых в сельскохозяйственном производстве и повышения интенсификации производства.

Исходя из цели, в процессе изучения дисциплины решаются следующие задачи:

- рассмотреть основные биологические системы, используемые в биотехнологии;
- продемонстрировать примеры использования микробиологических систем для производства и модификации различных продуктов, представляющих ценность для медицины, пищевой и химической промышленности, экологии и сельского хозяйства;
- рассмотреть круг фундаментальных и биотехнологических проблем, решаемых на основе использования методов культивирования изолированных клеток, органов и тканей растений;
- научить основным методам культивирования *in vitro*, используемых при создании новых генотипов сельскохозяйственных растений и для ускорения селекционного процесса;
- рассмотреть и обсудить вопросы биобезопасности продукции, создаваемой на основе методов биотехнологии.

## **2. ТРЕБОВАНИЯ К РЕЗУЛЬТАТАМ ОСВОЕНИЯ ДИСЦИПЛИНЫ**

В результате изучения дисциплины студент должен:

### **Знать:**

- основы клеточной, хромосомной и генной инженерии;
- основы клеточной селекции и мутагенеза для ускорения селекционного процесса;
- механизмы соматической изменчивости;
- особенности клонального микроразмножения и оздоровления растений в условиях *in vitro*;
- особенности получения биологически активных соединений в культуральных системах изолированных клеток и тканей растений;
- законы, указы, постановления, распоряжения, приказы, методические и нормативные материалы в области сельскохозяйственной биотехнологии и производства.

### **Уметь:**

- использовать методы биотехнологии в селекции растений, для сохранения биоразнообразия растений,
- работать со специализированной литературой, посвященной методам культивирования *in vitro* и направлениям сельскохозяйственной биотехнологии;
- анализировать и обсуждать научные факты достижений биотехнологии, представленные в научной литературе.

### **Владеть:**

- основными методами культивирования изолированных органов и тканей растений, используемых в сельскохозяйственной биотехнологии, методами создания новых биологических форм.

### 3. ТЕМА 1. ИСТОЧНИКИ ПИТАНИЯ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

#### 1.1. Минеральные вещества

В природных условиях произрастания у растений существует три источника питания:

1) *минеральные вещества*, поступающие с током воды из почвы через корневую систему;

2) *атмосферная углекислота*, превращаемая в процессе фотосинтеза в углеводы - основные источники энергии;

3) *витамины* и регуляторы роста и развития - *фитогормоны*, которые синтезируются в отдельных частях растений.

Для нормального жизненного цикла растению необходима группа основных химических элементов, функция которых не заменима другими химическими элементами. Их 19: углерод, водород, кислород, азот, фосфор, сера, калий, кальций, магний, железо, марганец, медь, цинк, молибден, бор, хлор, натрий, кремний, кобальт. Из них 16 - минеральные, а углерод, кислород и водород поступают в виде углекислого газа, кислорода и воды, которой в растении содержится около 50—98 %. Натрий, кремний и кобальт необходимы не всем растениям. Например, некоторые виды растений семейства маревых нуждаются в натрии, так как они адаптированы к условиям засоления.

В зависимости от потребности растений минеральных элементах последние разделяют на *макро-* и *микроэлементы*. Макроэлементы - фосфор, сера, калий, магний, железо, кремний, натрий. Микроэлементы - марганец, медь, цинк, кобальт, молибден, бор, хлор.

Основные функции отдельных элементов:

*фосфор* входит в богатые энергией фосфатные соединения, которые играют главную роль в энергетическом обмене, а также является составной частью нуклеопротеидов и нуклеиновых кислот;

**сера** входит в состав многих органических соединений, в том числе в состав ряда витаминов (липоевая кислота, биотин, тиамин), аминокислот (метионин, цистеин, цистин), глюкозидов;

**натрий** играет важную роль у растений-галофитов, у которых он создает высокое осмотическое давление в клеточном соке, что дает растению возможность извлекать воду из засоленных почв;

**кремний** необходим для построения клеток соломины злаков, стебля хвоща; соединения кремния повышают жесткость тканей растений; пониженное его содержание вызывает задержку роста кукурузы, ячменя, бобовых растений;

**калий** как одновалентный элемент повышает гидрофильность протоплазмы и увеличивает ее водоудерживающую способность; активизирует процессы передвижения ассимилятов из листьев к репродуктивным органам у злаков; на аммиачном фоне оказывает положительное влияние на синтез белков и процессы полимеризации углеводов; влияет на метаболизм фосфора;

**магний** входит в состав хлорофилла, играя основную роль в процессе фотосинтеза; ионам магния принадлежит основная роль в активировании деятельности отдельных ферментов;

**кальций** наряду с магнием входит в состав ядер и микросом и участвует в связывании нуклеотидов; входит в состав клеточной стенки; наибольшую потребность в кальции проявляют бобовые травы, у которых развитие корней протекает в среде, содержащей кальций;

**железо** необходимо для синтеза хлорофилла; кроме того, железо наряду с такими микроэлементами, как **медь и цинк** в соединении со специфическими белками образует основу ферментных систем;

**молибден и кобальт** участвуют в фиксации **атмосферного** азота; один из ферментов, участвующих в фиксации азота молибденсодержащая нитрогеназа, которая превращает азот аммиак или ионы аммония  $\text{NH}_4$ , используя энергию гидролиза АТФ;

**медь** участвует в работе многих ферментных систем; необходима для синтеза хлорофилла, способствует росту и развитию растений, повышая их устойчивость к холоду;

**марганец** является кофактором ферментов, обеспечивающих образование кислорода в хлоропластах растений в процесс фотосинтеза; недостаток марганца вызывает пятнистость листьев;

**бор** способствует нормализации процессов минерального питания растений; при недостатке бора у растений не развивают цветки, сахарная свекла болеет сердцевидной и сухой гнилью, лен бактериозом;

**хлор** необходим при фотосинтетическом выделении кислорода.

## 1.2. Витамины

Витамины – группа разнообразных по строению химических веществ, принимающих участие во многих реакциях клеточного метаболизма. Биосинтез витаминов осуществляется растениями и микроорганизмами, некоторые витамины синтезируются и в животных клетках. Основная часть витаминов входит в состав ферментов, катализирующих многие метаболически важные реакции. Витамины делятся на **водорастворимые** и **жирорастворимые**.

Водорастворимые витамины – В<sub>1</sub> (тиамин), В<sub>6</sub> (рибофлавин), В<sub>3</sub> (пантотеновая кислота), В<sub>5</sub> или РР (никотинамид), В<sub>6</sub> (пиридоксин), В<sub>9</sub> (фолиевая кислота), В<sub>12</sub> (цианкобаламин), витамин (пангамовая кислота). Витамин В<sub>9</sub> (фолиевая кислота), Н (биотин), С (аскорбиновая кислота), Р (рутин), U (S-метилметионин).

Жирорастворимые витамины - А (ретинол), D (эргокальцифитол), Е (токоферол), К (филлохинон).

**Витамин В<sub>1</sub> (тиамин)** был впервые получен в 1912 г. К. Функом из отрубей риса. Тиамин синтезируется растениями и микроорганизмами. Функциональная значимость витамина В<sub>1</sub> в составе ферментов - участие в

углеводном обмене. Содержится в больших количествах в злаковых растениях, говяжьей печени, капусте.

**Витамин В<sub>2</sub> (рибофлавин)** впервые выделен из молока и получен в кристаллическом состоянии в 1933 г. Р. Куном. Синтез витамина В<sub>2</sub> осуществляют растения, дрожжи, грибы, бактерии. Витамин В<sub>2</sub> в свободном состоянии находится в молоке, в микробных клетках - в виде флавинмонопнуклеотида (ФМН), в животных клетках - в виде флавинадениндинуклеотида (ФАД). ФМН и ФАД - коферменты около 30 ферментов, осуществляющие перенос водорода на различные субстраты. Особое значение имеют эти ферменты в процессах дыхания, переноса электронов и протонов. Значительные количества витамина - в говяжьей печени, меньше в курином желтке, пшенице, молоке и капусте.

**Витамин В<sub>3</sub> (пантотеновая кислота)** впервые идентифицирован Р. Вильямсом в 1933 г. Синтезируется микробными и растительными клетками. Активная форма пантотеновой кислоты – коэнзим А (КоА), который переносит кислотные радикалы на различные субстраты. Наибольшее содержание - в печени, яичном желтке, рыбе, картофеле, пшенице.

**Витамин В<sub>5</sub> (РР, никотинамид)** отнесен к витаминам в 1937 г. Никотинамид осуществляет биохимические функции в составе ферментов НАД и НАДФ, которые являются составной частью окислительно-восстановительных ферментов – дегидрогеназ. Большое количество витамина РР находится в рисовых пшеничных отрубях, печени, дрожжах.

**Витамин В<sub>6</sub> (пиридоксин)** открыт П. Дьерди в 1934 г. Синтезируется микроорганизмами, зелеными растениями, а у жвачных животных и человека - микрофлорой кишечника. Пиридоксин в виде фосфорнокислого эфира входит в состав ферментов декарбоксилирования и переаминирования аминокислот, то есть принимает участие в метаболизме аминокислот. Наибольшее его количество в печени, яйцах, дрожжах, моркови.



**Витамин В<sub>12</sub> (цианкобаламин) впервые** получен в кристаллическом состоянии в 1948 г. Е. Рикетсом и Е. Смитом. Цианкобаламин синтезируется в основном микроорганизмами, включая и кишечную микрофлору. Участвует во многих биохимических процессах, в том числе вовлекается в процесс образования форменных элементов крови и в обмен жиров в качестве протектора КоА.

**Витамин В<sub>15</sub> (пангамовая кислота) впервые** выделен Р. Томияма в 1950 г. из печени быка, а в 1951 г. Е. Кребсом из ядер абрикосовых косточек. Обладает липотропным действием. Это связано с процессами деметилирования и переметилирования в организме человека и животных.

**Витамин В<sub>9</sub> (фолиевая кислота, фолацин)** выделен в 1941 г. как фактор, предотвращающий развитие анемии у цыплят, выращиваемых на искусственной диете. Синтезируется микроорганизмам и растительными клетками, участвует в составе кофермента тетрагидрофолиевой кислоты в обмене белков и нуклеиновых кислот. Одной из наиболее важных реакций, в которых принимает участие фолиевая кислота, - это синтез пуринов.

**Витамин С (аскорбиновая кислота)** в кристаллическом виде, получен в 1923 г. Синтезируется растительными клетками и клетками большинства животных (место синтеза - печень и почки). Морские свинки, обезьяны и человек не способны к синтезу витамина С. Витамин С участвует во многих биохимических реакциях, являясь, в том числе, одним из компонентов антиоксидантной системы организма.

**Витамины группы Р (биофлавоноиды)** включают рутин, впервые выделенный А. Сент-Дьерди в 1936 г. из кожуры лимона. Известно более 100 биофлавоноидов, сходных по биологическим действиям с аскорбиновой кислотой. К числу биофлавоноидов относятся кумарины, антоцианы, гесперидин и др. Исходным продуктом синтеза биофлавоноидов в растительных клетках является шикимовая кислота.

**Витамин Н (биотин)** выделил в 1936 г. из яичного белка Р.

Кегль. Синтезируется зелеными растениями, грибами, бактериями. В продуктах животного происхождения биотин связан с белками, а в растениях - находится в свободном состоянии. Биохимическая роль биотина в основном проявляется в составе биотинов ферментов - карбоксилаз. Свободный биотин образует комплекс с токсическим белком куриных яиц - авидином, осуществляя его детоксикацию.

**Жирорастворимые витамины группы А** были открыты в начале XX в. Растения синтезируют в значительных количествах провитамины - каротины, которые при поступлении в организм человека или животного под действием фермента каротиназы превращаются в витамин А<sub>1</sub>.  $\beta$ -каротин в кристаллическом виде получают из люцерны, моркови, тыквы. Биохимическая функция витамина А в основном связана с влиянием на проницаемость клеточных мембран. Важную роль витамин А играет в фотохимических процессах зрения.

**Витамины группы D** выделены в первой половине XX в. Предшественники витамина D – вещества стероидной природы – синтезируются в дрожжах, растительных и животных тканях, Провитамин D поступает в организм в готовом виде, а провитамин D<sub>3</sub> синтезируется в животных тканях. Биологические функции витаминов группы D в основном связаны с действием их метаболитов. Так, физиологические концентрации кальция в крови поддерживаются системой, составной частью которой являются гидроксилированные формы D<sub>3</sub>.

**Витамины группы E (токоферолы)** открыты в 1922 г. Г. Эвансом и А. Бишо. Имеется три группы токоферолов, отличающиеся биологической активностью. Наибольшей биологической активностью обладает  $\alpha$ -токоферол. Биосинтез токоферолов осуществляется только зелеными растениями. Производство витамина E основано на выделении его из зародышей пшеницы методом спиртовой экстракции и отгонкой растворителя при низких температурах. Механизм действия

витамина Е в первую очередь связан с его антиоксидантными свойствами. Предотвращая процесс пероксидного окисления липидов, этот витамин **поддерживает** целостность биологических мембран, структурным компонентом которых он является.

Кроме того, к жирорастворимым витаминам относятся витамины *группы К, витамин F и убихинон (коэнзим Q)* - витаминоподобное вещество, по строению близкое витаминам К и Е.

## **2. Фитогормоны**

### **2.1. Общая характеристика**

Фитогормоны - это химические соединения, которые вырабатываются в микроколичествах в одной части растения, транспортируются в другие части, где, функционируя в клетках-мишенях, проявляют регулирующее действие на процессы роста и развития растения. Передача и трансформация гормонального сигнала осуществляется, как и у других организмов, в несколько этапов.

- Транспорт фитогормона.
- Образование гормон-рецепторного комплекса.
- Активированный гормон-рецепторный комплекс связывается с ядерными мембранами и перемещается в ядро клетки.
- Взаимодействие гормон-рецепторного комплекса с регуляторными последовательностями структурных генов, что приводит к увеличению транскрипционной активности.
- Отделение гормон-рецепторного комплекса от хроматина. Под действием ферментов происходит диссоциация комплекса гормон и рецептор.

Весь жизненный цикл растений, начиная от оплодотворения и заканчивая отмиранием, происходит при участии фитогормонов.

Кроме того, фитогормоны играют важную роль в реакции растений на

внешние воздействия и в формировании устойчивости растений к экстремальным условиям. В отличие от гормонов животных, фитогормоны гораздо менее специфичны, что проявляется в однотипном действии на одни и те же метаболические процессы различных фитогормонов.

Известны три класса фитогормонов, действующих преимущественно как **стимуляторы (ауксины, гиббереллины, цитокинины)**, и два класса фитогормонов, оказывающих главным образом **ингибирующее действие (абсцизовая кислота и этилен)**.

## 2.2. Ауксины

Термин «ауксин» (от греч. *ауксо* - *расту*) ввел Ч. Дарвин для обозначения вещества, которое предположительно должно транспортироваться от верхушки растения вниз, вызывая изгиб coleoptily злаков на одностороннее освещение. Позже это предположение подтвердилось. Ауксин впервые был выделен в 1926 г. немецким исследователем Вентом, а в начале 30-х гг. выделен в химически чистом виде.

Природный ауксин в растениях представлен в основном в виде - индолил-3-уксусной кислоты (гетероауксина) – ИУК, в меньших количествах - в виде индолов.

ИУК образуется у всех высших, многих низших растений и у бактерий. Многие эпифитные (заселяющие поверхность растения) бактерии синтезируют и выделяют ИУК, благодаря чему у растений повышается его общее содержание.

**Биосинтез ауксина.** Известны два универсальных пути синтеза ауксинов из триптофана. Первый путь синтеза ИУК из триптофана через индолилпировиноградную кислоту характерен для фасоли, капусты, тыквы: триптофан - индолилпировиноградная кислота - 3- индолилуксусный альдегид – ИУК. Второй путь синтеза ИУК через триптамин выявлен у

таких растений, как табак, томаты, овес, ячмень; триптофан - триптами́н - 3-индолилуксусный альдегид – ИУК.

Еще один путь синтеза ИУК описан у крестоцветных: 3-индолацетонитрил - ИУК. В свою очередь 3-индолацетонитрил может синтезироваться тремя путями, один из которых - из триптофана.

Избыток ауксина разрушается ИУК-оксидазой или переводится неактивные связанные формы, взаимодействуя с гликозидами, пептидами, некоторыми сахарами. В процессе поддержания ауксинового гомеостаза вовлечено большое число генов.

**Место синтеза ауксина** - быстро растущие части растения (меристемы побега, верхушки coleoptиле злаков, растущие зародыши и семяпочки), молодые листья и семядоли. Меристемы кончиков корней образуют небольшие количества ауксина. Значительные количества ауксинов накапливают запасующие ткани семян и пыльцы.

**Передвижение ауксина** базипетальное, т. е. от верхушки побегов к его основанию по паренхимным и камбиальным клеткам. Из листьев ауксин передвигается по флоэме. В корнях полярное передвижения ауксина выражена слабо. Транспорт ауксина требует энергии и может быть блокирован недостатком кислорода.

**Действие ауксина.** Ауксин действует практически во всех тканях растения. Наиболее выраженный эффект ауксина проявляется в стимуляции роста растяжением клеток coleoptиле и побегов. Ауксин предотвращает опадание плодов и листьев, притягивая к местам своего накопления питательные вещества. Передвигаясь вниз, ауксин подавляет развитие боковых побегов (явление апикального доминирования). Ауксин играет важную роль в процессах регенерации при размножении каллусных клеток, образующихся на раневых поверхностях; в процессе образования придаточных и боковых корней, луковиц, при заложении вегетативных почек.

Механизм действия ауксина на рост клетки связывают с активацией

H<sup>+</sup>-выкачивающего насоса в плазмолемме. Происходит подкисление клеточной стенки, что приводит к разрыву целлюлозных и пектиновых полимеров. Это облегчает растяжение растущей клетки под действием тургорного давления.

**Рецепторы ауксина.** Как у однодольных, так и у двудольных растений обнаружены мембранные белки, связывающиеся с ауксином. Наибольшее количество таких белков обнаружено в местах активного роста органов растения. Около 90 % всего количества белков, связывающих ауксин, локализовано в эндоплазматическом ретикулууме.

У кукурузы выявлено пять генов, кодирующих ауксин-связывающие белки.

**Синтетические ауксины.** Для практических целей в сельском хозяйстве и в работах по культивированию изолированных клеток и тканей растений часто применяют не ИУК, а синтетические ауксины, так как они в растениях не разрушаются ИУК-оксидазой,

Молекулы синтетических ауксинов имеют разную структуру, но содержат ароматическое или гетероциклическое кольцо, боковая часть которого представлена остатком алифатической кислоты.

По действию синтетические ауксины относят к сильным: индолил-3-масляная кислота (ИМК), α-нафтил-1-уксусная кислота (НУК), 2,4-дихлорфенокси-уксусная кислота (2,4-Д) и слабым: фенилуксусная кислота (ФУК), фенилмасляная кислота (ФМК). ИМК, НУК, ФУК используют для индукции корнеобразования, а 2,4-Д - в качестве гербицида, селективно убивающего двудольные растения.

### 2.3. Гиббереллины

Гиббереллины обнаружены в 20-е гг. японскими исследователями в виде продуктов обмена веществ *Fusarium moniliformetom* - конидиальной (споровой) стадии сумчатого гриба (аскомицета) *Gibberella fuyjikuroi*. Этот гриб, паразитируя на растениях

риса, выделяет большие количества веществ, вызывающих заболевание «баканэ» («бешеные всходы», «глупый рис»). Больные растения характеризуются чрезмерным ростом, приводящим к их гибели.

В 1935 г. одно из таких веществ было выделено и названо гиббереллином. В 50-е гг. Гиббереллины были обнаружены и тканях высших растений. В настоящее время выделено более сотни индивидуальных гиббереллинов, часть из которых обнаружена в грибах, а часть - в тканях растений.

В процессе промышленного производства гиббереллина были выделены физиологически активные индивидуальные компоненты, обозначенные как гиббереллины  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$  или соответственно в русской транскрипции – ГК<sub>1</sub>, ГК<sub>2</sub>, ГК<sub>3</sub> и т. д. В экспериментах чаще всего используют гибберелловую кислоту (ГК<sub>3</sub>), являющуюся одним из активных гиббереллинов.

Гиббереллины – это дитерпеноиды с тетрациклическим гиббереллановым скелетом из 19-20 С-атомов.

В тканях растений одновременно встречаются несколько гиббереллинов, а в процессе онтогенеза их набор и соотношение меняются. На последних этапах онтогенеза гиббереллины присутствуют в виде неактивных форм - гликозидов.

**Биосинтез гиббереллинов** происходит в интенсивно растущих органах: верхушках побегов, молодых листьях, растущих зародышах и других частях незрелых семян, реже в корнях. Предшественником биосинтеза гиббереллинов является ацетил КоА, из которого затем через мевалоновую кислоту и шикимовую кислоту образуется активный фитогормон.

**Передвижение гиббереллинов** не полярно, то есть может быть базипетальным, акропетальным, латеральным по клеткам ксилемы, флоэмы, паренхимным клеткам.

**Действие гиббереллинов.** Подобно ауксинам, гиббереллины вызывают множественные действия: стимулируют рост в фазе растения и деления

клеток (например, камбия), вызывают рост плодов. Рост в фазе растяжения индуцируется одновременно действием гиббереллинов и ауксина. При этом гиббереллины стимулируют переход клеток из фазы С, в S-период. В других случаях гиббереллины могут выступать как антагонисты ауксина, например, задерживать рост придаточных корней.

Важное свойство гиббереллинов - вызывать вытягивание стебля у розеточных растений или у растений с укороченным стеблем, т. е. устранять физиологическую и генетическую карликовость. Биосинтез гиббереллинов можно подавлять действием ретардантов.

Эту возможность используют для коммерческих целей, получая искусственные карлики у высокорослых сортов цветов. Гиббереллины, индуцируя экспрессию генов, контролирующих пути биотеза антоциана, усиливают пигментацию венчика цветков и контролируют цветение. На субклеточном уровне гиббереллины активируют транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  через плазматическую мембрану, понижают pH внутри клетки, влияют на ориентацию микротрубочек; изменяют проницаемость мембран растительных клеток. В качестве кандидатов на роль *рецепторов* рассматривают некоторые белки, для которых характерна гиббереллинсвязывающая активность.

**Гены-мишени.** Описаны как позитивно-, так и негативно регулируемые гиббереллинами гены. Одним из примеров позитивно регулируемых генов могут служить гены, контролирующие  $\alpha$ -амилазы и других гидролитических ферментов в клетках, алейронового слоя эндосперма злаков. Так, в прорастающих семенах злаков гиббереллины, образуясь в зародыше, переходят в клетки алейронового слоя эндосперма, где индуцируют образование и-РНК, ответственной за синтез  $\alpha$ -амилазы и других гидролитических ферментов. В свою очередь, эти ферменты расщепляют основное вещество эндосперма - крахмал до простых сахаров, которые усваиваются развивающимся зародышем.

Кроме того, к позитивно регулируемым генам относятся ген



кодирующие а- и в-тубулины и функционирующие в процессе растяжения клеток стебля растения под действием гиббереллинов.

Гиббереллины относят к **условно половым гормонам** растения, так как их высокий уровень, например, у тыквенных способствует образованию мужских цветков. Для практических целей наиболее часто используют гибберелловую кислоту. Обработка гибберелловой кислотой семян и клубней приводит к снятию у них стимулирующего быстрого прорастания. Действие гибберелловой кислоты на озимые злаки заменяет яровизацию, необходимую для таких растений. При обработке цветков винограда происходит увеличение размера ягод.

## 2.4. Цитокинины

**Цитокинины** – целое семейство близкородственных веществ производных аденина с разными замещающими группами. В организме различные формы цитокининов могут переходить в друг друга, при этом определенные наборы цитокининов характерны для каждого вида растений и мест их локализации в тканях растения.

Цитокинины были открыты сотрудниками Висконсинского университета под руководством Скуга и Миллера в 1955 г. изучении активного вещества, содержащегося в дрожжевом экстракте и стимулирующего рост каллуса сердцевины стебля табака.

В 1956 г. при деградации ДНК путем автоклавирования в среде был изолирован компонент (6-фурфуриламинопурин), активирующий деление клеток в культуре изолированных ней и названный кинетином (от слова «кинез» - деление). Другой природный цитокинин - **зеатин** - выделен в 1964 г. из иван кукурузы в стадии молочной спелости.

**Биосинтез цитокининов** происходит в кончиках корней, в том числе в придаточных, а также в развивающихся семенах и плодах.

В растительном организме существует два варианта синтеза

цитокининов: синтез *de novo* и гидролиз тРНК. Выделены гены, ответственные за синтез цитокининов.

Деградация цитокининов осуществляется под действием фермента цитокининоксидазы, которая отщепляет замещающую группу с освобождением аденина. Другим вариантом инактивации цитокининов является их соединение с низкомолекулярными веществами, такими как сахара и аминокислоты. Инактивированные таким образом цитокинины легко восстанавливают свою активность в результате их выщепления из соединений под действием специфических ферментов. Удобными моделями для изучения и регуляции скорости синтеза или деградации фитогормонов служат мутантные формы, в том числе и с измененным уровнем цитокининов. Как и мутации по другим фитогормонам, цитокининовые мутации можно разделить на два основных класса: мутанты с измененным уровнем гормона и мутации с нарушениями в процессах рецепции и передачи воспринятого сигнала.

**Транспорт цитокининов** - от кончиков корней вверх по растению с транспирационным током. Передвижение цитокинина ускоряется ауксином.

**Действие цитокининов** проявляется, прежде всего, в ускорении деления клеток, стимулируя переход из фазы  $G_2$  в фазу митоза.

Благодаря этому замедляется старение клеток и повышается устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды.

Цитокинины стимулируют прорастание семян и подавляют рост боковых корней. При избытке цитокининов у растения проявляется цитокининовый синдром: низкорослость и подавление апикального доминирования, приводящего к сильному ветвлению у растений. Во многих случаях для проявления действия цитокининов необходимо присутствие ауксина или одновременно и ауксина, и гиббереллинов. На субклеточном уровне цитокинины стимулируют репликацию ДНК, синтез всех типов РНК за счет активности РНК-полимераз, стимулирует образование митохондрий и хлоропластов. Под действием кинетина

происходит увеличение активности многих ферментов, в том числе нитратредуктазы и ферментов, участвующих в биосинтезе антоциана.

Выявлены мембранные белки - **рецепторы** цитокининов. Гены этих рецепторов выделены и секвенированы у *Arabidopsis*.

**Гены-мишени.** Выявлено более 40 генов, экспрессия которых контролируется цитокининами или позитивно, или негативно на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровне.

## **2.5. Абсцизовая кислот**

Абсцизовая кислота (АБК) (от *abscisio* - опадание) была открыта в 1950 г., а выделена в 1962 г. из пасоки, движущейся в весенний период по стволам древесных растений, а в 1963 г. и из листьев березы. Абсцизовая кислота относится к изопреноидным соединениям.

Описано два пути **биосинтеза абсцизовой кислоты**. Основной путь - из ацетил КоА через мевалоновую кислоту; запасной путь индуцируемый стрессами - из каротиноидов через ксантофилл.

**Место синтеза абсцизовой кислоты** - листья и корневой чехлик. В результате быстрого транспорта по флоэме и ксилеме абсцизовая кислота переносится в почки, клубни и семена, где накапливается.

**Действие абсцизовой кислоты** проявляется в задерживании роста в фазе растяжения и деления клеток, в ускорении опадания листьев и плодов, в индуцировании старения и состояния покоя растений (зимний покой многих древесных растений, покой семян). Абсцизовая кислота адаптирует растения к стрессу, защищает клетку от потери воды, влияя на замыкающие клетки устьиц, в период засухи и заморозков. Абсцизовая кислота оказывает противодействие ауксину (при опадании листьев и плодов, при росте в фазе растяжения), гиббереллинам (при покое почек, росте в растяжения клеток листа, образовании  $\alpha$ -амилазы в алейроновом слое зерновки), цитокининам - при старении. Выявлены белки,

рассматриваемые в качестве претендентов на роль *рецепторов* АБК.

*Гены-мишени*, регулируемые АБК, выявлены и изучены у пшеницы, ячменя, кукурузы. Как правило, белки, кодируемые этими генами накапливаются в семенах при их высыхании и в вегетативных тканях при стрессовых воздействиях, особенно в период засухи и заморозков.

## 2.6. Этилен

**Этилен** ( $\text{CH}_2 = \text{CH}_2$ ) - газообразный гормон, регулятор созревания плодов. Гормональное действие этилена было открыто Д. И. Нелюбовым в Санкт-Петербургском университете в 1901 г.

Биосинтез этилена происходит в клетках растений и грибов, исходными веществами этилена могут быть метионин, аланин, линоленовая кислота. Этилен вырабатывается в зрелых плодах в количестве, способном индуцировать дозревание незрелых плодов, помещенных в одну камеру со зрелыми. В незначительных количествах этилен содержится во всех тканях.

*Действие этилена.* Этилен играет большую роль в реакциях растений на стрессы и поражение патогенами. Так, этилен способен включать системы защиты растений от патогенов, индуцируя синтез ферментов, разрушающих клеточную стенку грибов, и регулируя синтез фитоалексинов. Под действием этилена при поранении растения активизируется к развитию особая ткань - раневая перидерма, изолирующая здоровую ткань от поврежденной, давая проникать бактериям и грибам. Этилен стимулирует локальный «листопад», когда поврежденный лист опадает на землю вместе с вредителем. Кроме того, этилен вызывает опадание созревших или поврежденных плодов, старение и опадание листьев.

В коммерческих целях для сохранения срезанных цветов в течение длительного времени их помещают в растворы, содержащие кроме минеральных солей и антисептиков и ингибиторы синтеза этилена.

Этилен *условно женский гормон*, его высокий уровень приводит к образованию женских цветков у тыквенных растений.

Выявлено семейство *этиленовых рецепторов*, которые могут частично замещать друг друга.

***Гены-мишени.*** Показано, что этилен активирует экспрессию генов, связанных с его биосинтезом, и гены, вовлеченные в защитные реакции при поражении патогенами - реакции SAR (системная приобретенная устойчивость).

Интегральное действие всех классов фитогормонов, последовательно индуцирующих активность большого числа генов, хорошо изучено на примере контроля над процессами развития и созревания плодов томатов. Первый этап развитие цветка, сопровождается активным делением клеток будущего плода. Этот этап находится под контролем ауксинов, цитокининов, гиббереллинов. Позже доминирующее влияние оказывают гиббереллины, стимулирующие растяжение клеток увеличивающегося в размере плода, затем активизируется абсцизовая кислота, индуцирующая начало созревания плода. На этапе увеличения массы плода и его полного созревания отмечена активность ауксинов и этилена. Помимо описанных пяти групп фитогормонов свойствами регуляторов роста и развития растений, в том числе влияющих на развитие и созревание плодов, обладают и другие вещества - *брассиностероиды, системин, полиамины, салициловая кислота, жасмоновая кислота*.

## **4. ТЕМА 2. ТЕХНИКА ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ**

### **2.1. Приготовление питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей растений (общепринятая методика)**

Питательные среды для культивирования изолированных клеток и тканей должны включать все необходимые для жизнедеятельности растений макроэлементы: азот, фосфор, калий, кальций, серу, магний, железо; микроэлементы: бор, цинк, медь, марганец и др., а также витамины (В1, В6, В12, РР и другие), углеводы, фитогормоны или их синтетические аналоги. Некоторые питательные среды включают гидролизат казеина, аминокислоты. Кроме того, в состав питательных сред входит этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) или ее натриевая соль (трилон Б), которые улучшают доступность железа для клеток в широких пределах рН.

Углеводы являются незаменимыми компонентами питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей, так как в большинстве случаев последние неспособны к автотрофному питанию. Чаще всего в качестве источника углерода используют сахарозу или глюкозу в концентрациях 2-4 %. Полисахариды, как правило, не применяются. Для культивирования опухолевых тканей, содержащих активные гидролитические ферменты (амилазу и др.), в качестве углевода используют растворимый крахмал.

Фитогормоны необходимы для дедифференцировки клеток и индукции клеточных делений. Поэтому для получения каллусных тканей в состав питательных сред должны обязательно входить ауксины, вызывающие клеточную дедифференцировку, и цитокинины, индуцирующие деление дедифференцированных клеток.

Для индукции каллусогенеза используют более высокие концентрации

ауксинов, в дальнейшем ткань может расти при более низком содержании ауксинов.

В случае индукции стеблевого морфогенеза содержание ауксинов может быть снижено или же они могут быть полностью исключены. На безгормональной среде растут опухолевые и «привыкшие» ткани. Автономность по отношению к обоим гормонам или к одному из них связана со способностью этих клеток продуцировать гормоны.

В качестве ауксинов в питательных средах используют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) - 0.1-10 мг/л, индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) - 1-30 мг/л, а-нафтилуксусную кислоту (НУК) - 0.1-2 мг/л. ИУК почти в 30 раз менее активна, чем 2,4-Д. Для индукции каллуса обычно необходимы высокие концентрации ауксинов (чаще всего 2,4-Д); при последующих пересадках их уменьшают. Из веществ, обладающих цитокининовой активностью, в питательных средах используют кинетин, 6-бензиламинопурин (БАП), 2-изопен-тениладенин (*2ip*), зеатин (0.001-10 мг/л). БАП и зеатин по сравнению с кинетином более активны в отношении поддержания роста изолированных тканей и индукции органогенеза. В состав некоторых питательных сред входит аденин.

Кроме ауксинов и цитокининов в отдельные питательные среды включают гибберелловую кислоту (ГК), присутствие которой в среде не является обязательным, но в некоторых случаях она стимулирует рост изолированной ткани.

Для индукции первичного каллуса и реже для поддержания его пролиферативной активности в состав питательной среды иногда рекомендуется вносить растительные экстракты или соки. Наибольшей ростактивирующей способностью обладает кокосовое молоко - жидкий эндосперм кокосового ореха.

Для приготовления твердых питательных сред используют агар-агар - полисахарид, получаемый из морских водорослей (ламинарий). Наименьшее

количество нежелательных примесей содержит бактериальный агар (*Bacto Agar* или агар отечественного производства). Обычно концентрация агара в среде составляет 0,7 %.

Состав питательных сред для культивирования биотехнологических объектов зависит от типа их питания:

- среда без глюкозы – для хлореллы, цианобактерий;
- среда без витаминов и гормонов – для грибов (фузариума, ботритиса) и для ряски (*Lemna*);
- среда с азотом, сахарами, витаминами и гормонами – для культивирования клеток и тканей высших растений.

С целью рационального использования времени растворы макро- и микросолей, витаминов и фитогормонов готовят более концентрированными, что позволяет многократно их использовать, доводя до нужной концентрации. Концентрированные (маточные) растворы хранят в холодильнике (причем для хранения растворов витаминов нужна отрицательная температура).

Для культивирования клеток, тканей и органов растений используют питательные среды различного состава. В настоящее время известно большое число различных по составу питательных сред – Мурасиге и Скуга, 1962; Гамборга и Эвеленга, 1968; Уайта, 1939; Нича и Нич, 1974-1975; Шенка-Гильдебранта, Грессхофф-Доу, но наиболее часто применяемая при выращивании изолированных растительных тканей в условиях *in vitro* среда Т. Мурасиге и Ф. Скуга, впервые составленная в 1962 г. Эта среда содержит хорошо сбалансированный состав питательных веществ и отличается от других, как правило, соотношением аммонийного и нитратного азота. Пригодна для образования каллусов, поддержания неорганизованного каллусного роста, индукции морфогенеза у большинства двудольных растений. При преобладании ауксина образуются корни, преобладание кинетина – образование стеблевых культур. Среда Мурасиге-Скуга и Шенка-Гильдебранта считаются средами с высоким содержанием солей по



сравнению со средами Уайта и Гамборга (B<sub>5</sub>). Содержат большие количества калия, фосфора и микроэлементов.

Среда Гамборга и Эвеленга хорошо подходит для культивирования клеток и тканей бобовых растений и злаков, среда Уайта обеспечивает укоренение побегов и нормальный рост стебля после регенерации, а среда Нича и Нич обеспечивает индукцию андрогенеза в культуре пыльников.

Наиболее широко применяются среды Мурасиге-Скуга (МС), Уайта, Гамборга (B<sub>5</sub>) (табл. 1).

**Материалы и оборудование:** стаканы химические на 1 л (4 шт.), мерные цилиндры на 500 мл и 1 л (2 шт.), колбы с притертыми пробками для хранения маточных растворов (на 1 л - 3 шт., на 100 мл - 1 шт.), флаконы из-под пенициллина (10 шт.), мерные пипетки на 10 мл и 1 мл, весы технические, весы торсионные или аналитические, электроплитка, химреактивы.

**Ход работы.** Маточные растворы солей готовят на дистиллированной воде. Каждую из макросолей растворяют в отдельном стаканчике при нагревании, а затем сливают и объем доводят до 1 л, причем раствор  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  вливают последним без нагревания в охлажденную смесь, что предотвращает выпадение осадка. Соль  $CaCl_2$  готовят и хранят отдельно. Хелат железа (раствор  $FeSO_4$  и  $Na_2$  ЭДТА), готовят при нагревании и хранят отдельно. Каждую соль микроэлементов также растворяют отдельно и сливают в общий стаканчик, а объем доводят до 100 мл. Полученные растворы макро- и микроэлементов сливают в колбы с притертой пробкой (хелат железа - в темную колбу), наклеивают этикетку и помещают в холодильник.

Таблица 1- Расчеты для приготовления маточных растворов по МС

Компоненты питательной среды	Навеска	Количество маточного раствора для приготовления 1 л питательной среды
Макросоли, г на 1 л маточного раствора		
$KNO_3$	38	50
$NH_4NO_3$	33	
$KH_2PO_4$	3,4	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,4	
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	8,8	5
Микросоли, мг на 100 мл маточного раствора		
$H_3BO_3$	620	1
$MnSO_4 \cdot 2H_2O$	2230	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	860	
$KI$	83	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	25	
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	2,5	
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	2,5	
Хелат железа, мг на 100 мл маточного раствора		
$FeSO_4$	557	5
$Na_2$ ЭДТА	745	

Для приготовления концентрированных растворов витаминов берут 10-кратные навески и растворяют их (каждый витамин в отдельности) в 10

мл воды; 1 мл содержит концентрацию витамина, необходимую для приготовления 1 л раствора по прописи Мурасиге-Скуга. Хранят растворы во флаконах из-под пенициллина в замороженном состоянии.

Растворы фитогормонов готовят следующим образом: берут 10 мг вещества, ауксины (2,4-Д, ИУК, НУК) растворяют в 0,5-2,0 мл этанола, цитокинины (кинетин, зеатин, БАЛ, *2ip*) — в небольшом количестве 0,5 н. *HCl* или *KOH*, абсцизовую кислоту (АБК) — в 70 %-ном этаноле. Затем растворы подогревают (кроме АБК) и доливают водой до объема 100 мл (1 мл содержит 1 мг гормона). В холодильнике их можно хранить при температуре +4°C не больше 1 мес. На основе маточных растворов готовят питательную среду МС, которая будет использована в дальнейших работах.

*Приготовление питательной среды:* в химический стакан емкостью 1 л помещают 30 г сахарозы, доливают дистиллированной водой примерно до 400 мл и после растворения сахарозы вносят необходимые количества маточных растворов макросолей, микросолей (табл. 1), витаминов и гормонов, после чего проверяют pH раствора. Если pH превышает 5,5-5,6, в питательную среду вносят 0,1 %-ный раствор *HCl*. Одновременно в другом стакане нагревают предварительно замоченный для набухания агар-агар, осторожно помешивая до полного растворения. Его сливают с приготовленными растворами и доводят объем до 1 л.

Приготовленную питательную среду разливают в пробирки, стеклянные банки или колбы (примерно на 1/3 объема), закрывают ватными пробками или алюминиевой фольгой и стерилизуют в автоклаве.

## **2.2. Методы стерилизации растительных объектов и оборудования при проведении работ с культурой изолированных клеток и тканей растений (общепринятая методика)**

Одним из основных условий успешного культивирования изолированных органов, тканей, клеток и протопластов является соблюдение

строгой стерильности, так как на искусственных питательных средах хорошо развиваются микроорганизмы, в результате чего существенно меняется состав питательных сред и легко повреждаются изолированные ткани, клетки и в особенности протопласты.

Только некоторые объекты (хлорелла, азолла) можно выращивать в нестерильных условиях.

**Стерилизация** - полное уничтожение микроорганизмов и их покоящихся форм (например, спор). Существуют разные методы стерилизации: с помощью влажного пара, сухого пара, облучения ультрафиолетовыми лучами, обработки химическими веществами и микрофильтрации.

Опыты проводят в стерильных помещениях - боксах или ламинар-боксах. Стерилизуют бокс, инструменты, посуду, растительный материал, питательные среды, ватные пробки и все другие материалы.

*Стерилизация ламинар-бокса.* Ламинар-боксы предназначены для культивирования изолированных клеток, тканей и некоторых других работ, требующих стерильности, которая обеспечивается с помощью бактериальных воздушных фильтров. За 10-20 мин до начала работы ламинар-бокс облучают бактерицидными ультрафиолетовыми лампами. Предварительно в ламинаре размещают спиртовую горелку, спички, фарфоровый стакан с 96 %-ным спиртом и стерильной водой, а при изолировании меристем - и бинокулярную лупу. Внутреннюю поверхность ламинара, лупу, спиртовку, пробирки или колбы с питательной средой протирают 70 %-ным спиртом.

Перед началом работы в ламинар-боксе работающий должен вымыть руки с мылом и протереть их спиртом, надеть стерильный халат, завязать волосы стерильной марлевой косынкой.

*Стерилизация посуды.* Вначале посуду тщательно моют с использованием детергентов (порошок «Прогресс» и др.), а также раствора двухромовокислого калия в серной кислоте (хромпик). Вымытую посуду

трижды ополаскивают дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу. Чтобы избежать заражения простерилизованных предметов из воздуха, перед стерилизацией их заворачивают в оберточную бумагу или фольгу (у стаканов, колб достаточно обернуть только горлышко).

Затем посуду помещают в сушильный шкаф и прогревают при 160°C в течение 2 ч (с момента установки нужной температуры). За это время погибают не только бактерии, но и их споры. Еще более строгой стерилизации можно добиться под давлением в автоклаве, поскольку влажный жар более губителен для микроорганизмов и спор. Посуду (стаканы с крышками, чашки Петри, пипетки) заворачивают в фольгу или оберточную бумагу, сверху - в целлофан; верхнюю часть градуированных пипеток закрывают ватой, каждую заворачивают в бумагу. Автоклавировать под давлением 1-2 атм., при температуре 100-130°C в течение 25-30 мин.

*Стерилизация инструментов.* Предварительная стерилизация инструментов (скальпелей, пинцетов, игл и т. д.) заключается в нагревании их сухим горячим жаром в сушильном шкафу в течение 2 ч при 140-160°C. Шприцы, ножницы, пробочные сверла удобнее кипятить. Металлические предметы нельзя автоклавировать: под действием пара они ржавеют и тупятся. Непосредственно перед работой и в ее процессе инструменты (пинцеты, скальпели, микробиологические петли) еще раз стерилизуют в ламинаре, помещая их в фарфоровый стакан с 96 %-ным этиловым спиртом, обжигая в пламени спиртовки. После этого каждый инструмент помещают между листами предварительно простерилизованной плотной бумаги, сложенной в пачку. ***Стерильный инструмент используют только для одноразовой манипуляции.*** Перед повторным употреблением его следует снова простерилизовать спиртом и обжечь. Очень тонкие инструменты (иглы, кусочки лезвий) могут терять свои свойства при обжигании, поэтому их стерилизуют, погружая в спирт.

*Стерилизация материалов.* Вату, марлю, ватные пробки, бумажные «матрасики», фильтровальную бумагу, халаты, косынки стерилизуют в

автоклаве под давлением 1-2 атм. в течение 25-30 мин. «Матрасики» заворачивают в плотную бумагу, а сверху - в целлофан.

*Стерилизация растительного материала.* Для стерилизации семян, верхушечных меристем, кусочков ткани, выделенных из различных частей растения, применяют следующие растворы: 0,1 %-ной сулемы (двухлористая ртуть), 0,1 %-ного диацита, 13-20 %-ной перекиси водорода, 10 %-ного хлорамина, 8 %-ного гипохлорита натрия или кальция.

Диацит готовят, растворяя отдельно 330 мг этанолртутихлорида и 660 мг цетилпиридиния хлорида в горячей воде (около 300 мл), затем их смешивают и доводят объем жидкости до 1 л, добавляют несколько капель детергента твин-80; хранят в плотно закрытой колбе в темноте. Перед стерилизацией ткань растения предварительно очищают. Корнеплоды, клубни, толстые стебли растений тщательно моют щеткой с мылом в теплой проточной воде, снимают кожуру (у корней и корнеплодов), кроющие чешуи (у листьев), промывают дистиллированной водой и опускают на несколько секунд (семена - на 1-2 мин) в 70 %-ный этиловый спирт. Обработка тканей этанолом повышает эффект основного стерилизующего раствора. Затем растительные объекты многократно прополаскивают в стерильной воде.

Перекись водорода рекомендуется использовать для фасоли, люпина, подсолнечника (с очищенной кожурой), сулему - для томатов, тыквы и др. Продолжительность стерилизации семян сулемой - 10-15 мин, перекисью водорода - 30 мин, для меристем и кусочков тканей требуется примерно в 2 раза меньше времени. Опушенные семена (хлопчатник) обрабатывают концентрированной серной кислотой в течение 5 мин. Легче всего семена отмываются от перекиси водорода. После сулемы и диацита воду меняют 5-6 раз.

При работе с тканями или с семенами с шероховатой поверхностью к раствору гипохлорита натрия добавляют смачивающее вещество (0,05% раствора детергента типа «тинол»), способствующее лучшему распределению стерилизатора на поверхности ткани и обезвреживанию от

микроорганизмов.

Семена томатов, яблони, тыквы, бобов и табака ко времени созревания заключены в мясистые, деревянистые или костянквидные покровы. Поэтому здоровые, с неповрежденной поверхностью плоды этих культур необходимо достаточно тщательно промыть мыльной водой, затем несколько раз - спиртом, после чего в строго асептических условиях их разрезают. Стерильным пинцетом вынимают семена и помещают их в стерильные чашки Петри для проращивания.

Поверхностная стерилизация освобождает эксплант только от наружной инфекции. Если же ткани экспланта имеют внутреннюю инфекцию, то его необходимо обработать антибиотиками.

*Стерилизация питательных сред.* Разлитые в пробирки или стеклянные колбы питательные среды закрывают ватными пробками или фольгой, завертывают в целлофан и автоклавируют при температуре 120°C и давлении 1 атм. в течение 20 мин. Для получения стерильной воды в колбу наливают 1/3 часть объема дистиллированной воды, закрывают ватной пробкой или фольгой, а сверху плотной бумагой и целлофаном.

*Холодная стерилизация.* Органические жидкости, не поддающиеся термической обработке, - гормоны - освобождают от бактерий путем пропускания их через стерильные мелкопористые бактериальные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм.

### **2.3. Условия культивирования**

Для успешного культивирования изолированных клеток и тканей растений необходимо соблюдать определенные условия выращивания. Большинство каллусных тканей не нуждается в свете, так как не имеют хлоропластов и питаются гетеротрофно. Исключение составляют некоторые зеленые каллусные ткани, такие, как каллусная ткань мандрагоры. В некоторых случаях каллусные ткани, не способные к автотрофному питанию,

все же выращивают на непрерывном освещении, что является необходимым условием дальнейшего успешного морфогенеза, как у люцерны. Большинство же каллусных тканей получают в темноте или при рассеянном свете.

Детерминированные к морфогенезу ткани переносят на свет и далее культивируют их при освещенности 1000—4000 лк.

Культивирование изолированных меристем и их микроразмножение также происходит на свету. Освещенность факторостатной (световой) комнаты должна составлять в зависимости от культуры 3000—10 000 лк. Необходимо учитывать фотопериод, который требуется для данного культивируемого объекта. Влажность в культуральной комнате должна составлять 60—70 %. Более сухой воздух способствует усыханию питательной среды в пробирках и колбах, если они закрыты ватными пробками, изменению ее концентрации и нарушению условий культивирования. Для повышения влажности в комнате можно использовать поддоны с водой.

Оптимальная температура для большинства культивируемых тканей 5—26°C, для культуры тканей тропических растений она может достигать 29—30°C. В случае индукции морфогенеза температуру понижают до 18—20°C.

Наилучшие световой и температурный режимы, а также режим оптимальной влажности можно создать с помощью климатических камер.

#### **2.4. Получение стерильных эксплантов из семян огурца (*Cucumis sativus* L.) и мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.)**

*Объяснение.* Для получения стерильных семян из селекционных образцов огурца и пшеницы необходимо правильно выбрать стерилизующий агент. Наиболее распространенными в культуре *in vitro* стерилизаторами являются вещества, содержащие активный хлор: гипохлориты кальция и натрия в концентрации 35 г/л; стерилизующие растворы, содержащие ртуть — сулема и диацид в концентрации 0,1 %; перекись водорода в концентрации



10-12 %; антибиотики в концентрации 4-5 мг/л. Как правило, вещество должно обеспечивать наибольший процент неповрежденных тканей под семенной оболочкой, способных к росту и новообразованиям при наименьшем проценте инфекции. Следует подбирать также и длительность стерилизации эксплантов (табл. 2).

Таблица 2 - Стерилизация исходного растительного материала  
(по Р.Г. Бутенко, 1990)

Объект, взятый для стерилизации:	Время стерилизации, мин.			
	Диацид, ОД %- ный	Сулема 0,1 %-ная	Гипохлорит Na 5- 9 %-ный	Перекись водорода 12%-ная
<u>Семена</u> сухие набухшие	15-20 6-10	10-15 6-8	15-20 10-15	12-15 6-8
<u>Ткани</u> мясисто- корня, клубня одревесневшего стебля	20-30	15-25	15-20	-
	20-40	20-25	20-25	
<u>Листья</u>	1-3	1-3	3-6	3-5
<u>Апексы</u>	1-10	1-7	3-15	2-7

Перед стерилизацией семена тщательно отмывают на сите теплой проточной водой, затем завязывают тугим узлом в марлевые мешочки, которые подписывают этикетками с указанием номера генотипа и вносят в стерильный бокс, где последовательно проводят все операции по стерилизации. Стерильные проростки, полученные из семян, используют в дальнейшей работе для: 1) получения эксплантов верхушечных меристем (огурец); 2) получения первичного каллуса из тканей листьев, сегментов щитка и изолированных зародышей (пшеница).

*Материалы и оборудование:* семена огурца и пшеницы (20 шт.), стерильные чашки Петри с 1-2 слоями фильтровальной бумаги, пробирки, колбы на 250 мл со стерильной дистиллированной водой (3 шт.), стерильные пинцеты, ножницы, стерильные марлевые мешочки, 0,1 %-ный раствор сулемы, 96 %-ный этиловый спирт, стерильные химические стаканы (3 шт.), спиртовка, спички.

*Ход работы.* Отбирают по 10 семян огурца и пшеницы, тщательно промывают в мыльном растворе с последующей отмывкой водопроводной водой. Помещают в марлевые мешочки и в ламинар-боксе погружают на 10 с в 96 %-ный этиловый спирт, затем в 0,1 %-ный раствор сулемы или диацита на 10-15 мин. Затем семена промывают в 3-5 объемах стерильной дистиллированной воды и слегка подсушивают. Пинцетом раскладывают по 10 семян в чашки Петри на 1-2 слоя фильтровальной бумаги и добавляют по 10-15 мл стерильной воды, закрывают крышками и парафином. Чашки Петри с подготовленным объектом помещают в термостат с 25°C или на 2-3 суток в климатическую камеру для прорастания.

## **5. ТЕМА 3. КУЛЬТУРА КАЛЛУСНЫХ ТКАНЕЙ**

Культура изолированных тканей обычно бывает представлена каллусными или реже — опухолевыми тканями.

Каллусная культура — это неорганизованная пролиферирующая ткань, состоящая из дедифференцированных клеток. В дальнейшем они специализируются как каллусные, т. е. становятся особым образом дифференцированными. Каллус, что означает «мозоль», может образовываться как на изолированных кусочках ткани (эксплантах) *in vitro*, так и на растении при поранении.

Каллусная ткань *in vitro* в основном бывает белого или желтоватого, реже светло-зеленого цвета. Очень редко она может иметь интенсивную зеленую окраску (у мандрагоры). Темно-коричневая окраска чаще всего

появляется при старении каллусных клеток и связана с накоплением в них фенолов. В зависимости от сорта, применяемых гормонов и условий культивирования каллусная ткань картофеля может иметь белый, желтый, серый или светло-коричневый цвет, по мере старения она темнеет. Последние окисляются в хиноны. Для избавления от этих соединений в питательные среды вносят антиоксиданты.

Каллусная ткань аморфна и не имеет конкретной анатомической структуры, но в зависимости от происхождения и условий выращивания она может быть разной консистенции:

- рыхлой, состоящей из сильно обводненных клеток, легко распадающейся на отдельные мелкие агрегаты;
- средней плотности, с хорошо выраженными меристематическими очагами;
- плотной, в которой дифференцируются элементы камбия и проводящей системы.

Обязательным условием дедифференцировки растительной клетки и превращения ее в каллусную является присутствие в питательной среде представителей двух групп фитогормонов: «ауксинов и цитокининов. Ауксины вызывают процесс дедифференцировки клетки, подготавливающий ее к делению, а цитокинины — пролиферацию (деление) дедифференцированных клеток. Если в питательную среду без гормонов поместить кусочек стебля, листа, корня (без верхушки) или любой другой растительный эксплант, состоящий из специализированных (дифференцированных) клеток, то деления клеток не произойдет и каллусная ткань не образуется. Это связано с неспособностью дифференцированных клеток к делению. Каждая клетка проходит три фазы роста:

- деление;
- растяжение;
- дифференцировку.

Характерные черты заключительной фазы роста — утолщение

вторичной клеточной стенки и потеря клеткой способности к делению. Для того чтобы дифференцированные клетки вновь приобрели способность к делению, необходимо, чтобы произошла их дедифференцировка, т. е. клетки как бы возвратились в меристематическое состояние. Деление дедифференцированных клеток приводит к анархическому, неорганизованному росту, в результате чего образуется каллусная ткань. Таким образом, превращение специализированной клетки в каллусную связано с индукцией клеточного деления, способность к которому она потеряла в процессе дифференцировки.

Каллусную ткань можно получить на искусственных питательных средах, включающих фитогормоны, из различных частей растений: стеблей, корней, тканей клубня, листа, зародыша и др.

### **3.1. Получение и культивирование каллусной ткани из различных эксплантов стерильных проростков подсолнечника (*Helianthus annuus* L.), огурца (*Cucumis sativus* L.)**

В ответ на поранение паренхимные клетки, помещенные на питательную среду, содержащую фитогормоны, дедифференцируются, переходят к делению и образуют каллусную ткань.

Процесс каллусогенеза зависит от размера первичного экспланта, его места расположения на растении, возраста и состава питательной среды. У подсолнечника каллус может быть получен из любых тканей проростков: гипокотиля, корня, семядолей.

Для каллусогенеза пригодны все части растения, однако ткани стебля наиболее легко образуют каллус и их значительно легче ввести в стерильную культуру. Культивирование фрагментов семядолей, листьев и гипокотилей огурца на питательных средах определенного состава приводит к следующим морфогенетическим процессам:

- образованию эксплантом первичного каллуса с последующей

регенерацией адвентивных почек;

- образованию меристематических очагов в первичной и пересадочной каллусной ткани.

Каллусная ткань огурца, образованная в условиях *in vitro*, обычно имеет темно-зеленый, темно-желтый или желто-зеленый оттенок в зависимости от выбранного генотипа. По консистенции каллус огуречного растения близок к желеобразному и рыхлому.

**Порядок выполнения работы.** Ламинар-бокс протирают изнутри спиртом. Перед началом работы стерильную питательную среду разогревают на плитке до полного расплавления агара и остужают до 37...46°C (температуру определяют рукой: дно колбы должно быть теплым). Колбу с питательной средой помещают в ламинар-бокс, после чего ее открывают и обжигают горлышко над пламенем спиртовки. В стерильные чашки Петри, предварительно вынутые из крафт-бумаги, наливают по 15..20 мл среды. Чашки Петри держат открытыми 10... 15 мин с целью предотвращения образования конденсата на крышках, после чего их закрывают.

Пробирки с растениями протирают спиртом, горлышко обжигают над пламенем спиртовки. Стерильное растение вынимают пинцетом из пробирки и кладут его на стерильный матрасик. Придерживая растение пинцетом, проросток разделяют на отдельные сегменты: корень, гипокотиль, семядоли длиной 5...7 мм. Стерильным скальпелем делают надсечки на эксплантах для появления в дальнейшем в местах поранения раневого каллуса. Пораненные экспланты размещают на поверхности агаризованной среды, чуть вдавливая их пинцетом для усиления контакта со средой. В каждую чашку помещают по 10...20 эксплантов. Чашки Петри закрывают и обматывают парафилмом в два слоя. Парафилм при обматывании следует равномерно натягивать для предотвращения разрывов при его усыхании. Чашки Петри ставят в климакамеру, где поддерживают температуру 22...25 °C и влажность воздуха 70 % и освещенности 8...10 тыс. лк.

Через 3 недели рассматривают, зарисовывают каллус,

образовавшийся из различных эксплантов стерильных проростков подсолнечника и огурца заполняют таблицу, выполненную по форме 1.

*Форма 1* - Каллусогенез и органогенез эксплантов, изолированных от стерильных проростков подсолнечника и огурца

Первичный эксплант	Количество эксплантов, шт.		Число калусов, образовавших		Способность калусной ткани к	
	высажено	образовали каллус	корни	зачатки стебля	ризогенезу	морфогене зу
Гипокотиль						
Семядоли						
Листья						

**Материалы и оборудование.** Чашки Петри с 7-дневными стерильными проростками подсолнечника и огурца; фарфоровый стаканчик с 96%-ным этанолом; стерильные скальпели, пинцеты, бумажный матрасик, чашки Петри; спиртовка; спички; вата для стерилизации ламинар-бокса; колба с модифицированной средой МС для каллусогенеза подсолнечника и огурца.

### 3.2. Получение и культивирование каллусной ткани из корнеплодов моркови (*Daucus carota* L.)

Впервые культура каллусной ткани из корнеплодов моркови была получена французским ученым Готре в 1932 г. Эта ткань, благодаря пассированию (пересадке) ее на свежую питательную среду, продолжала расти неопределенно долгое время, не утрачивая способность к делению. Образование каллусной ткани происходит в области первичных или

вторичных меристем, а также из паренхимы, прилегающей к этим меристемам или к вторичным сосудистым тканям. Инициация каллуса из паренхимы или камбия активируется при наличии в экспланте зрелой сосудистой ткани.

Процесс каллусогенеза зависит от размера первичного экспланта. Чем он крупнее, тем разнообразнее набор клеток, что обуславливает более сложные отношения между основной тканью и клетками, дающими начало каллусообразованию. Первичный эксплант обычно имеет размер 5...10 мм<sup>3</sup> и массу 20...100 мг.

**Порядок выполнения работы.** Отбирают здоровые корнеплоды моркови, тщательно моют щеткой с мылом, затем промывают водопроводной водой и погружают для стерилизации в 96%-ный спирт на 5 мин без дальнейшего промывания стерильной водой.

В стерильных условиях отрезают верхнюю часть корнеплода моркови и стерильным пробкобуром извлекают цилиндры из ткани. Эксплант корнеплода моркови должен содержать ксилемную, флоэмную паренхиму и камбий. Изолированные цилиндры помещают в стерильную чашку Петри и разрезают на диски шириной 1...2 мм, на которых затем делают надсечки. Далее с помощью пинцета их переносят на питательную среду МС. Культивируют в термостате или световой комнате при температуре 25 °С. Через 3 нед характеризуют и зарисовывают сформировавшуюся каллусную ткань.

### **3.3. Пассирование каллусной ткани огурца (*Cucumis sativus* L.) на свежую питательную среду**

Пассирование каллусной ткани проводят (в зависимости от интенсивности роста) по истечении 4...6 нед. Обычно цикл выращивания составляет 4 нед. После того как на сегменте экспланта образовался хороший каллус, его изолируют и переносят на свежую питательную среду для

самостоятельного роста в культуре. У огурца этот процесс продолжается 2...3 нед. Первичные каллусы в стерильных условиях ламинар-бокса делят скальпелем на кубики размером 4...3 мм<sup>3</sup> (масса 100 мг). Частота дальнейших пассажей зависит от скорости роста каллусной ткани, диаметра культурального сосуда и количества питательной среды. Обычно при пассировании культуры огурца и пшеницы ткань часто погибает после трех-четырех пассажей. Чтобы этого не происходило, к питательной среде с минеральной основой МС или Уайта, содержащей сахар и микроэлементы, добавляют витамины, ауксины и растительные экстракты, например, кокосовое молоко. Причиной задержки или полной остановки роста каллусной ткани может быть возникновение анаэробных условий во внутренних участках ткани, при которых в последней накапливаются токсические вещества и ингибируется клеточное деление. Колонии тканей, выращиваемых в пассируемой культуре, могут значительно различаться по морфологии; они могут быть сферическими (калусная ткань огурца), ленточными и пластинчатыми, а также бесформенными, растущими по типу бактериальной культуры (например, калусная ткань пыльников пшеницы).

**Порядок выполнения работы.** Чашку Петри с каллусной культурой открывают, предварительно сняв парафилм, и пинцетом извлекают каллус. На стерильной чашке Петри его разделяют скальпелем на кусочки массой до 100 мг и помещают на поверхность агаризованной питательной среды МС, закрывают крышками и обматывают парафилмом. Чашки с высаженными 5-ю культурами (по 3...7 шт. в каждой) ставят в световую комнату. Через 1 нед растущие каллусные культуры описывают по морфологическим признакам и заполняют таблицу, выполненную по форме 2.



*Форма 2* - Характеристика каллусной ткани огурца в зависимости от выбранного экспланта

Эксплант, образовавший каллус	Интенсивность каллусообразования	Цвет каллусной ткани	Наличие меристематических очагов	Консистенция	Сырая масса, мг	
					в начале пассажа	в конце пассажа
Гипокотиль						
Семядоля						

## 6. ТЕМА 4. ВТОРИЧНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА И МОРФОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ КАЛЛУСНЫХ ТКАНЕЙ. ПОЛУЧЕНИЕ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ

Конечным результатом всех работ по культуре растительных клеток и тканей, за исключением тех случаев, когда клеточную суспензию используют для получения веществ вторичного синтеза, является регенерация растений из каллусных клеток. В ее основе лежит вторичная дифференцировка каллусной клетки.

Благодаря присущему клетке свойству тотипотентности из каждой каллусной клетки (независимо от того, из какого органа растения был взят эксплант) может регенерировать целое растение. Однако эта потенциальная способность реализуется далеко не всегда. До сих пор не получены растения-регенеранты из одной изолированной клетки (протопласта) некоторых бобовых растений и большинства хлебных злаков: пшеницы, ржи, кукурузы и др. (исключение составляет рис.) Разные генотипы в пределах любого вида растений обладают неодинаковой регенерационной способностью. Поэтому изучение механизма регенерации растений из каллусных клеток, оптимизация состава питательных сред и условий культивирования для

индукции морфогенеза являются важнейшими вопросами культивирования изолированных клеток и тканей растений.

Существуют различные типы морфогенеза: соматический эмбриогенез и органогенез, который подразделяют на стеблевой и корневой. При соматическом эмбриогенезе из каллусных клеток формируются биполярные структуры, подобные зародышу, у которых одновременно дифференцируются меристемы корня и стебля. В случае стеблевого органогенеза образовавшийся побег пересаживают на среду с повышенным содержанием ауксинов для дальнейшего укоренения сформировавшихся микропобегов. Если же морфогенез осуществляется по типу корневого органогенеза, то практически не удается получить побеги из корней.

Процесс вторичной дифференцировки *in vitro* зависит от многих факторов, главные из которых следующие: генотип, возраст, тип первичного экспланта, сезонность изоляции, минеральный состав питательной среды, баланс экзогенных и нативных гормонов, условия выращивания, а также присутствие сигнальных белков и белков-акцепторов.

Способность каллусных клеток к формированию монополярных и (или) биполярных структур главным образом зависит от видовых и сортовых особенностей исследуемых генотипов, для которых принципиально важно учитывать принадлежность к однодольным или двудольным растениям, а также тип первичного экспланта.

Материнский эффект при наследовании способности к морфогенезу отмечали многие ученые (В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, Е. С. Воронин и др., 2003). Однако никто не уточнял, какие именно органеллы (хлоропласты или митохондрии) несут гены, ответственные за регенерационную способность растительных тканей. В работах, проведенных Ю. Я. Долгих (2005), показано, что все стерильные линии кукурузы обладали пониженной способностью индуцировать морфогенный каллус по сравнению с фертильной формой. На основании полученных данных было сделано предположение о вероятном участии митохондриальных генов в регуляции

процесса морфогенеза.

Физиологический возраст первичного экспланта, из которого была получена каллусная ткань, имеет несомненное значение для проявления способности каллусных клеток к морфогенезу. Установлена прямая корреляция между возрастом первичного экспланта и морфогенезом: чем моложе эксплант, тем большей морфогенетической активностью обладают каллусные клетки. С увеличением возраста исходного материала, как правило, снижается способность каллусной ткани к морфогенезу.

Существенное влияние на реализацию морфогенетического потенциала каллусной ткани оказывает число субкультивирований последней в условиях *in vitro*. С увеличением числа пассажей значительно снижается степень морфогенетической активности каллусных клеток. Такая зависимость особо сильно проявляется на трудных объектах, таких, как: пшеница, ячмень, рис, подсолнечник и др.

Применение экзогенных гормональных препаратов и изменение их соотношения и концентраций являются главными факторами, влияющими на морфогенез каллусной ткани. Преобладание ауксинов над цитокининами приводит к дифференциации меристематических очагов корня, а преобладание цитокининов над ауксинами — меристематических очагов апекса, дающих начало росту адветивных побегов.

Изучению регуляции морфогенеза экзогенными факторами посвящено много работ, однако молекулярные механизмы эндогенной регуляции почти не исследованы. Учитывая большое значение баланса эндогенных гормонов в определении тотипотентности (Л. А. Лутова, 2003) можно предположить, что компетентность клеток к морфогенезу в значительной степени обусловлена количеством и соотношением эндогенных регуляторов роста. При сопоставлении уровней гормонов в морфогенных и неморфогенных тканях некоторых видов растений были обнаружены заметные различия. Экспериментально доказано, что в большинстве случаев для морфогенных тканей характерны преобладание цитокининов над ауксинами и невысокий

уровень АБК, а для неморфогенных — обратное соотношение (Ю. И. Долгих, 2005).

Из трофических факторов особое внимание необходимо уделять наличию в питательной среде минеральных солей, содержащих азот в нитратной или аммонийной форме. Присутствие в среде  $\text{NH}_4^+$  необходимо для начала морфогенеза, тогда как для роста и развития дифференцированных морфогенных структур предпочтение по концентрации отдается  $\text{NO}_3^-$ .

Не только минеральные соли могут регулировать морфогенетические процессы в каллусной ткани. Аминокислоты (тирозин, аспарагин, глютамин), а также нитрат серебра (ингибирует синтез этилена), добавленные в питательную среду, значительно повышают морфогенетическую активность каллусных клеток.

Особое влияние на морфогенез каллусной ткани оказывают стрессовые факторы, такие, как: тяжелые металлы, хлорид или сульфат натрия, низкие положительные температуры, низкие Концентрации токсинов или культурального фильтрата патогенов. Например, в конце 60-х гг. XX в. в лаборатории академика РАСХН и чл.-корр. РАН Р. Г. Бутенко Института физиологии растений РАН на культуре ткани моркови показано стимулирующее действие 0,5%-ного NaCl на морфогенез и регенерацию растений *in vitro*, что было в дальнейшем подтверждено на каллусной культуре пшеницы. На культуре каллусных клеток риса установлена существенная роль низких положительных температур на морфогенетический потенциал дедифференцированных клеток.

Интенсивность освещения, спектральный состав света, температурный режим, а также другие физические факторы воздействия оказывают особое влияние на морфогенез каллусной ткани. Доказано, что дифференциация адвентивных почек в каллусной ткани происходит при ее культивировании на свету с белым или синим спектром, в то время как при использовании света красного спектра в каллусной ткани дифференцируются

меристемы корня. Для большинства растений температурный оптимум составляет 23...25 °С. Однако среди исследуемых растений существуют исключения, например, подсолнечник, для которого температурный режим, обеспечивающий морфогенез каллусной ткани, находится в пределах 18...22 °С.

Таким образом, для повышения морфогенетического потенциала каллусной ткани необходимо подбирать индивидуальные условия культивирования для каждого исследуемого генотипа, учитывая при этом их наследственные особенности.

#### **4.1. Индукция стеблевого органогенеза в культуре каллусной ткани картофеля (*Solanum tuberosum* L.)**

Для индукции органогенеза каллусную ткань, полученную из стеблевого или листового экспланта стерильного растения картофеля (2-й и последующие пассажи), пересаживают на среду с высоким содержанием цитокининов, а для укоренения образовавшихся побегов используют среду с повышенным содержанием ауксинов. Индукция морфогенеза и регенерация растений — сложный, многоступенчатый процесс. У картофеля этот процесс можно подразделить на несколько стадий:

- индукцию зеленых меристематических зон;
- появление почек *de novo*;
- формирование микропобегов с последующим их укоренением.

Чем моложе каллусная культура (т. е. чем меньше времени прошло с момента ее получения), тем больше ее регенерационная способность. Состав сред для индукции морфогенеза и регенерации растения у разных сортов картофеля неодинаковый, но общим правилом является повышенное содержание цитокининов (зеатина или БАП).

**Порядок выполнения работы.** Каллус вынимают из пробирки или чашки Петри, помещают на стерильный матрасик, разделяют ткань на

кусочки размером 5 x 5 мм, после чего стерильным пинцетом переносят на агаризованную питательную среду для индукции морфогенеза. Пробирку закрывают пробкой (в случае использования чашек Петри их закрывают крышками и парафилмом) и ставят в световую комнату с температурой 20...25 °С, освещенностью 3 тыс. лк и влажностью воздуха 70%. Через 1 нед отмечают появление структурированных очагов и через 3...5 нед — меристематических зон ярко-зеленого цвета. Через следующие 1...2 нед отмечают появление апексов. В рабочую тетрадь записывают количество апексов, появившихся на каждом каллусе. При дальнейшем культивировании апексы превращаются в микропобеги. На одном экспланте может дифференцироваться до нескольких десятков побегов. Когда они достигнут высоты 10 мм, их отделяют от каллусной ткани и переносят на среду для укоренения. Через 5...10 дней отмечают появление корней.

**Материалы и оборудование.** Стерильные чашки Петри или пробирки, колба со средой для морфогенеза (приложение 10); длинный или короткий пинцет; матрасик; каллус картофеля в пробирке или в чашке Петри; спиртовка; спирт; спички; вата.

#### **4.2. Индукция стеблевого органогенеза и соматического эмбриогенеза в каллусной ткани моркови (*Daucus carota* L.). Получение растений-регенерантов**

В каллусной ткани моркови при пересадке ее на среду, содержащую 0,2 мг/л БАП, индуцируется образование почек или эмбриоидов, из соматических клеток возникают структуры, подобные нормальным зародышам. Через 2...3 нед в каллусах развиваются зеленые почки или эмбриоиды размером 0,5...2,0 мм. Их образованию предшествует возникновение на светлой поверхности каллусной ткани зеленых очагов, которые появляются через несколько дней после пересадки. Почки или эмбриоиды могут развиваться одновременно на одном каллусе.

Для получения растений-регенерантов сформировавшиеся зачатки стеблей и эмбриоидов помещают на среду без гормонов, где через 2...3 нед формируются растения. Иногда может наблюдаться нарушение нормального развития растений (образование каллусной ткани, преимущественное развитие корня или побега, утолщение различных органов). В этом случае материал следует пересаживать на среду без гормонов и с уменьшенной вдвое концентрацией всех входящих в нее компонентов. Срок, необходимый для прохождения всех стадий процесса регенерации растений из тканевых культур, составляет около 2 мес.

**Порядок выполнения работы.** Каллусную ткань, полученную из корнеплодов моркови, пересаживают на новую питательную среду МС с добавлением БАП (0,2 мг/л). Эта среда стимулирует дифференцировку в каллусной ткани клеток меристематического и эмбрионального типа, из которых в дальнейшем формируются почки и эмбриоиды соответственно. Пересаженные каллусы помещают в световую комнату (16-часовой фотопериод). Через 3 нед отмечают развитие зеленых почек или эмбриоидов. Результаты зарисовывают. Сформировавшиеся почки или эмбриоиды используют для получения растений-регенерантов. Для этого их переносят с соблюдением строгой стерильности на агаризованную питательную среду МС без гормонов и выращивают в световой комнате. В одну колбу на 100 мл с 25 мл питательной среды следует высаживать 4...6 почек или эмбриоидов. Через 3 нед записывают результаты. Отмечают образование побегов и проростков, формирование растений-регенерантов.

**Материалы и оборудование.** Культура каллусной ткани моркови; колбы на 100 мл со стерильной питательной средой МС; стерильные чашки Петри, инструменты; спиртовка; спирт; спички.

## 7. ТЕМА 5. КУЛЬТУРА КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ

Культуру клеточных суспензий можно получить из каллусной ткани, поместив ее в жидкую питательную среду с автоматическим перемешиванием. Используя ферменты, например, пектиназу, получают суспензионную культуру непосредственно из ткани экспланта (лист, стебель, корень и т. д.). Вначале на поверхности экспланта образуется каллусная ткань, а затем уже от нее отделяются клетки и клеточные агрегаты, в результате чего образуется клеточная суспензия.

Для получения 100 мл клеточной суспензии необходимо 2...3 г свежей каллусной ткани.

Необходимое условие культивирования клеточных суспензий — постоянное перемешивание или встряхивание среды. Если клеточная суспензия находится в неподвижном состоянии, то деление суспензионных клеток приводит к образованию каллусной ткани.

Деление суспензионных клеток поддерживается при наличии в среде ауксинов и цитокининов, т. е. тех гормонов, которые необходимы для индукции и роста каллусных клеток. Таким образом, суспензионные культуры представлены типичными каллусными клетками, обладающими всеми свойствами, характерными для клеток такого рода.

Суспензии лучше образуются из рыхлой каллусной ткани, получаемой на средах с 2,4-Д. При исключении из питательной среды ионов кальция суспендирование облегчается. Еще более интенсивно этот процесс идет при добавлении в среду фермента пектиназы, который разрушает пектат кальция, склеивающий отдельные клетки.

В биотехнологии клеточные суспензии используют для получения вторичных метаболитов, многие из которых являются ценными лекарственными препаратами, для промышленного выращивания клеточной биомассы и для клеточной селекции. Наряду с этим суспензии клеток можно применять в качестве исходного материала для получения изолированных



протопластов.

При использовании суспензионных культур в качестве продуцентов вторичных веществ применяют закрытые или открытые системы ферментеров в периодическом или проточном режимах выращивания клеток. В закрытой системе клеточная суспензия лишена притока свежей питательной среды до конца выращивания, а в случае непрерывного режима выращивания в открытой системе питательную среду меняют на свежую. Как при периодическом, так и при проточном режимах выращивания в открытой системе клетки остаются в питательной среде и не удаляются даже при ее замене. Однако в открытых системах культивирования при замене питательной среды (периодическом или непрерывном) вместе со средой отбирают и часть суспензионных клеток.

### **Основные характеристики суспензионной культуры**

Для работы с клеточными суспензиями необходимо знать их характеристики: жизнеспособность, плотность клеток в суспензионной культуре, степень агрегированности, скорость роста.

1. *Объем осажденных клеток (ООК).* Переносят небольшой объем суспензионной культуры в мерную пробирку объемом 15 мл, лучше всего коническую. Центрифугируют 5 минут при 200 g. ООК - величина, которую составляет объем осадка от объема суспензии, обычно в %.

2. *Плотность клеточной популяции.* Число клеток подсчитывается в камере Фукса-Розенталя под микроскопом после мацерации. В качестве мацерирующего вещества применяют 10..20%-ную хромовую кислоту, которая гидролизует срединные пластинки, соединяющие клетки. Плотность суспензии, то есть число клеток в 1 мл рассчитывают по формуле

3. *Сырая и сухая масса.* Суспензия клеток фильтруется через смоченный и взвешенный фильтр, вложенный в воронку Бюхнера под слабым вакуумом. Клетки промывают дистиллированной водой, оттягивают воду под вакуумом и взвешивают снова вместе с фильтром. Сухая масса –

определяется аналогично, но взвешивается сухой фильтр, а клетки сушат вместе с фильтром в термостате при 60°C до постоянной массы.

4. *Содержание белка.* Для определения белка клетки собирают на фильтре из стекловолокна, дважды промывают кипящим раствором 70% этанола, сушат ацетоном, гидролизуют 1М NaOH при температуре 85°C полтора часа. Затем фильтруют и определяют белок по Лоури.

5. *Проводимость среды.* Определяют с помощью кондуктометра. Как правило, она обратно пропорциональна свежей массе клеток.

6. *Жизнеспособность клеток* оценивают, изучая движение цитоплазмы под микроскопом, а также по окрашиванию красителем (флюоресцеиндиацетат, соли тетразолия, синий Эванса, метиленовый синий). Перед использованием подбирают pH инкубационного буфера, концентрацию красителя, время инкубации, строят калибровочные кривые для смеси живых и убитых клеток. Живые клетки не окрашиваются метиленовым синим вследствие непроницаемости для него клеточных мембран. В мертвые клетки краситель легко проникает, и они окрашиваются в синий цвет.

Существует правило: если более 50 % клеток в агрегате не окрашивается, он считается живым.

Одним из основных показателей, характеризующих состояние клеточной суспензии, служит плотность клеточной популяции. Число клеток определяют в счетной камере Фукса-Розенталя (рис. 2) под микроскопом после мацерации (разделения клеток). В качестве мацерирующего вещества применяют хромовую кислоту (10...20%-ную), которая гидролизует срединные пластинки, соединяющие клетки.

Хорошо растущая суспензия имеет, как и каллусная культура, S-образную кривую роста. Различают три фазы ростового цикла суспензии:

- лаг-фаза (2...3 сут);
- фаза экспоненциального роста (2...10 сут);

- стационарная фаза (10...15 сут).

Продолжительность фаз зависит от вида растений и первичного экспланта, из которого получена каллусная культура (и затем суспензия), начального количества клеток (первичного инокулята), условий выращивания. Обычно длительность пассажа составляет 14...16 дней. При этом плотность возрастает от  $5 \cdot 10^4$  до  $5 \cdot 10^6$  кл/мл. Суспензию для субкультивирования берут в конце экспоненциальной фазы. Увеличение числа клеток, их сырой и сухой массы — основные критерии роста суспензионных культур.

Качество суспензии зависит от степени агрегированности ее клеток. Агрегаты не должны содержать более 10...12 клеток. Поэтому, чтобы удалить крупные агрегаты, суспензию фильтруют через марлевые, нейлоновые или металлические фильтры. Одновременно это дает возможность освободиться от остатков экспланта или плотных кусков каллусной ткани. Суспензионная культура различается по степени агрегированности. Она бывает мелкоагрегированная, среднеагрегированная, крупноагрегированная.

**Порядок выполнения работы.** Для подсчета жизнеспособности клеток на предметное стекло наносят каплю суспензии, рядом — каплю красителя. Смешивают стеклянной палочкой. Смесь переносят в камеру Фукса-Розенталя.

Камеру Фукса-Розенталя и покровное стекло предварительно моют хромпиком, а затем высушивают. Притирают покровное стекло к камере до появления колец Ньютона. Пипеткой с узким носиком набирают суспензию клеток и подносят к краю покровного стекла, при этом жидкость заполняет весь объем камеры.

Под микроскопом подсчитывают число живых и мертвых клеток; одиночных клеток, мелких и крупных агрегатов; общее число клеток. Подсчет клеток осуществляют в пяти больших квадратах (в четырех по диагонали и в одном в любом верхнем или нижнем углу сетки).

### **5.1. Получение суспензионной культуры из каллусной ткани картофеля (*Solanum tuberosum* L.) и ее пассирование**

Обычно клеточную суспензию получают из рыхлой каллусной ткани, помещая ее в жидкую (без агара) питательную среду того же состава, что и для каллуса, и выращивают в колбах на качалке (при 100 мин<sup>-1</sup>). Успех работы зависит от того, насколько удачно выбрана или подготовлена каллусная ткань: она должна быть рыхлой, легко распадающейся на небольшие клеточные агрегаты и отдельные клетки. Для получения суспензионной культуры берут жизнеспособную, интенсивно пролиферирующую каллусную ткань. При переносе клеток на свежую питательную среду берут только мелкие агрегаты.

Минимальный объем инокулята (критическая концентрация клеток в суспензии), обеспечивающий клеточное размножение, обычно составляет 10...20 % общего объема суспензии в начале культивирования. Повышенные количества инокулята приводят к ингибированию роста клеточной популяции вследствие недостатка кислорода и накопления в среде токсических продуктов метаболизма.

Длительность первого цикла выращивания клеточной суспензии обычно составляет 3...4 нед и зависит от:

- исследуемого генотипа растения, из которого она получена;
- первичного экспланта и его возраста;
- состава питательной среды;
- условий выращивания;
- частоты вращения роллера.

Последующие циклы сокращаются до 2 нед. В процессе выращивания каллусных клеток в суспензионной культуре часть клеток отмирает, а другая — интенсивно делится. Клеточную суспензию необходимо пересаживать один раз в две недели.

**Порядок выполнения работы.** Открывают чашку Петри с каллусной

тканью, стерильным пинцетом перекалывают кусочки рыхлого каллуса на стерильную чашку Петри, отбирают светлые участки и помещают их в колбочки со стерильной жидкой средой для суспензии из расчета 3...5 г каллуса на 100 мл жидкой среды. Объем суспензии должен составлять 10...20 % объема колбы (например, в колбу вместимостью 500 мл наливают 50...100 мл суспензии). Колбу закрывают ватно-марлевой пробкой с целлофаном или фольгой и ставят на качалку на 3...4 нед (оптимальная длительность первого пассажа).

Пассирование суспензионной культуры осуществляют одним из следующих способов.

Суспензию оставляют на 1...2 мин, чтобы осели крупные агрегаты. Стерильной пипеткой берут несколько миллилитров суспензии из верхней части ее объема.

Суспензию профильтровывают через капроновую ткань или нейлоновый фильтр и добавляют в нее свежую среду.

Суспензии дают отстояться 1...2 мин и переливают 5...10 мл в колбу со свежей средой.

Горлышко колб необходимо обжигать над пламенем спиртовки до и после пересадки.

Обычно для хорошо растущей суспензионной культуры используют разведение 1:10, т. е. в колбу на 500 мл помещают 5 мл суспензии и 45 мл свежей среды. Более точно разведение определяют исходя из ростовых характеристик.

Пересадив суспензию одним из перечисленных способов, обжигают горлышко колбы, закрывают ее ватно-марлевой пробкой с целлофаном или фольгой и ставят колбу на качалку до следующей пересадки.

**Материалы и оборудование.** Каллусная ткань, полученная из различных эксплантов стерильных растений картофеля; колбы с жидкой питательной средой; стерильные пинцет, скальпель, чашка Петри; спиртовка; спирт; спички; вата.

## **5.2. Высев суспензионной культуры на твердую агаризованную питательную среду (метод плейтинга)**

Для проведения работ по клеточной селекции мелкоагрегированную суспензионную культуру высевают на агаризованную питательную среду. При этом одиночные клетки и клетки, входящие в состав мелких агрегатов, делятся и образуется каллусная ткань, из которой в дальнейшем формируются растения-регенеранты.

**Порядок выполнения работы.** Клеточную суспензию переливают в стерильный цилиндр и оставляют на 5 мин. Пипеткой отбирают 5 мл верхней фракции суспензии (она обогащена одиночными клетками) и смешивают в стерильном цилиндре с 5 мл теплой (36 °С) питательной среды для роста каллусной ткани. Эта среда должна содержать двойное количество агара, т. е. 1,4 %. Содержимое цилиндра быстро разливают в чашки Петри, дают остыть, закрывают крышками и парафином.

Через 3...5 нед подсчитывают колонии клеток диаметром более 1 мм. Эффективность посева, %, рассчитывают по формуле

Плотность посева обычно оставляет  $1 - 10^5$  клеток на 1 мл. Этот показатель не должен быть очень высоким, чтобы растущие колонии не сливались. Через 3 нед подсчитывают количество колоний в каждой чашке Петри.

**Материалы и оборудование.** Суспензионная культура; стерильные чашки Петри цилиндр, среда для роста клеточной суспензии с двойным содержанием агара (1,2... 1,4 %).

## **8. ТЕМА 6. КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ**

Под клональным микроразмножением растений понимают бесполое размножение на искусственных питательных средах в условиях *in vitro*. Этот метод имеет следующие преимущества перед традиционными способами

размножения растений:

- получение генетически однородного посадочного материала;
- получение безвирусных растений за счет использования меристемной культуры;
- высокий коэффициент размножения (например, из одного растения земляники можно получить в год 1 млн растений);
- сокращение продолжительности селекционного процесса;
- ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития;
- возможность проведения работ в течение года и экономия площадей, необходимых для выращивания посадочного материала;
- возможность размножать трудноукореняемые растения (например, розы, орхидеи, орехоплодные и хвойные растения);
- пробирочные растения легко транспортировать на любые расстояния.

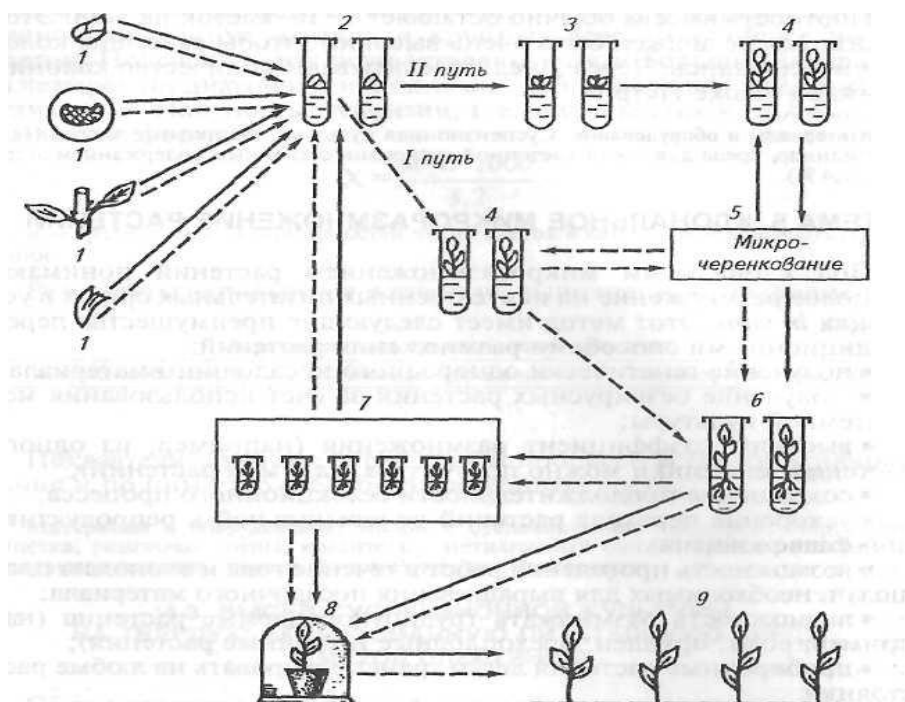
Процесс клонального микроразмножения включает в себя четыре этапа:

- выбор растения-донора и получение хорошо растущей стерильной культуры;
- собственно микроразмножение;
- укоренение микропобегов и при необходимости их депонирование при пониженных температурах;
- адаптацию пробирочных растений к почвенным условиям теплицы или открытого грунта (рис. 3).

Существует несколько методов клонального микроразмножения растений:

- активация развития уже существующих в растении меристем (апекс стебля, пазушные и спящие почки и интеркалярные зоны стебля);
- индукция возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта;

- индукция соматического эмбриогенеза;
- дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани.



**Рис. 1.** Схема клонального микроразмножения растений методами: активации развития существующих меристем (I путь), индукции образования адвентивных почек на первичном экспланте (II путь):

1 — исходный эксплант; 2 — получение стерильной культуры; 3 — образование адвентивных почек непосредственно на первичном экспланте; 4 — рост почек и формирование микропобегов; 5 — размножение микропобегов (микрочеренкование); 6 — укоренение микропобегов; 7 — депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре (+2 °C); 8 — перевод растений в тепличные условия; 9 — высадка растений-регенерантов в поле

За последнее десятилетие технология микрклонального размножения стала коммерческим производством. Наибольшее рас-



пространение микрклональное размножение получило при культивировании декоративных и тропических растений, а для картофеля, аспарагуса, земляники, некоторых подвоев яблони и персика оно начинает заменять традиционные способы размножения и селекции.

### **6.1. Изолирование и культивирование апикальных меристем картофеля (*Solanum tuberosum* L.)**

Культуру изолированных апикальных меристем используют для получения свободного от вирусов посадочного материала и для микрклонального размножения растений. Метод основан на том, что ближе к верхушке больного растения наблюдается снижение количества вирусов. Апикальная меристема обычно свободна от вирусов, она представляет собой конус активно делящихся клеток высотой 0,1 мм (100 мкм) и шириной 0,25 мм. Поскольку меристеме бывает трудно изолировать без повреждения, ее часто отделяют с одним-двумя листовыми зачатками (апексы размером 100...250 мкм). Для повышения эффективности оздоровления картофеля метод верхушечной меристемы сочетают с термо- и химиотерапией. Тепловая обработка вызывает инактивацию вирусов, химические вещества ингибируют их развитие. Безвирусные растения размножают *in vitro* и высаживают в теплицы *in vivo* для получения безвирусных клубней. Для ускоренного размножения оздоровленного материала используют также клубни, образовавшиеся на безвирусных растениях *in vitro*.

**Порядок выполнения работы.** Клубни картофеля хранят при температуре 4...6 °С, затем проращивают в темноте при 20...22° С. Работы по изолированию меристем проводят в ламинар-боксе, простерилизованном с помощью бактерицидных ламп. Рабочее место (стол, бинокулярную лупу) и штативы с пробирками протирают спиртом. Инструменты (пинцеты, скальпели, иглы) стерилизуют перед каждой манипуляцией, погружая их в спирт и обжигая над пламенем спиртовки.

Ростки картофеля опускают в химический стакан и заливают 0,1%-ным раствором диазида на 3...5 мин (либо 1...6%-ным раствором гипохлорита кальция или натрия, либо 0,1%-ным раствором сулемы). Затем не менее 3-х раз промывают стерильной водой, помещают в стерильную чашку Петри и добавляют несколько капель стерильной воды для предупреждения подсыхания. Перед изолированием меристем с помощью препаровальной иглы под бинокулярной лупой с верхушки ростка удаляют покровные листочки, последовательно обнажая боковые и верхушечные меристемы с примордиальными листочками. Меристему, включающую кусочек ткани размером 100...250 мкм без листовых зачатков (при-мордиев), изолируют обычной тонкой иглой, зажатой в цанговый держатель. Изолировать можно как верхушечную, так и боковые меристемы. Каждую операцию проводят отдельным простерилизованным инструментом. Меристему на острие иглы переносят на поверхность питательной среды в пробирку, которую закрывают пробкой над пламенем горелки и ставят в штатив. Штатив с пробирками закрывают целлофаном для предупреждения подсыхания среды и ставят в световую комнату.

В качестве питательной среды используют модифицированную среду МС, заранее приготовленную и простерилизованную в автоклаве при давлении 1 атм в течение 20 мин.

Через 2, 3, 4 нед проводят наблюдения за развитием из меристем побега и зарисовывают этапы этого процесса.

**Материалы и оборудование.** Клубни картофеля; бинокулярная лупа; стерильные скальпели, препаровальные иглы; пробирки со стерильной питательной средой.

## **6.2. Клональное микроразмножение картофеля (*Solatum tuberosum* L.) путем черенкования побегов**

Одним из наиболее распространенных способов размножения

картофеля является черенкование в пробирочной культуре. Для этого растения делят на сегменты (черенки), которые пересаживают в пробирки с питательной средой МС. Размножение методом черенкования предусматривает, прежде всего, удаление верхушечной почки, чтобы исключить апикальное доминирование и стимулировать рост пазушных меристем.

Черенкование проводят с интервалом 24...28 дней. Из одного растения получают 5...8 черенков, за 2...3 мес это составит 3...5 тыс. растений, а за 7 мес — 30...40 тыс. растений. Укоренение происходит спонтанно.

Пересадка растений-регенерантов в почвенные условия — ответственный этап, завершающий процесс клонального микроразмножения. Наиболее благоприятное время для пересадки пробирочных растений — это весна или начало лета. Растения с двумя-тремя листьями и хорошо развитой корневой системой осторожно вынимают из колб или пробирок пинцетом, корни отмывают от остатков агара и высаживают в почвенный субстрат легкого гранулометрического состава. При необходимости растения подкармливают растворами Кнопа, Кнудсона и др.

**Порядок выполнения работы.** Пробирочное растение картофеля вынимают в ламинар-боксе из пробирки, помещают в чашку Петри,резают на сегменты (отрезок стебля с листом и пазушной почкой). Часть стебля над листом при этом должна быть в 2...3 раза меньше, чем часть ниже листа. Необходимо соблюдать строгую стерильность. Черенки помещают на модифицированную питательную среду МС в пробирки. Для предотвращения попадания микроорганизмов горлышко пробирки обжигают над пламенем спиртовки. Пробирку с черенком зарисовывают и ставят в световую комнату. Через 7 и 14 дней проводят наблюдение за развитием побега и зарисовывают последовательные этапы развития растения из черенка.

**Материалы и оборудование.** Пробирочные растения картофеля; пробирки с модифицированной стерильной питательной средой МС

(приложение 16); стерильные скальпели, пинцеты, чашки Петри; спиртовка; спирт; спички; вата.

## **9. КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ И ЗАДАНИЯ**

1. Каковы главные направления исследования культуры изолированных клеток и тканей растений в биотехнологии?

2. Назовите компоненты основных питательных сред, используемых для каллусогенеза, различных типов морфогенеза и клонального микроразмножения.

3. Расскажите о способах стерилизации оборудования.

4. Опишите устройство ламинар-бокса и порядок работы в нем.

5. Какие вещества необходимо применять для освобождения растительных тканей от внутренней инфекции?

6. Можно ли для стерилизации растительного материала применять спирт и ультрафиолетовое излучение? Объясните, почему.

7. Что такое каллусная ткань и как ее получают? Каковы возможности ее использования в биотехнологии?

8. Где в природе можно наблюдать формирование каллусной ткани?

9. Что такое дедифференцировка клеток и почему она является обязательным условием перехода специализированной клетки к делению и каллусообразованию?

10. Какие гормоны являются индукторами дедифференцировки?

11. Что представляют собой опухолевые и «привыкшие» ткани? Каково их сходство и различие с каллусными?

12. Что такое тотипотентность каллусных клеток и какова частота ее реализации?
13. Назовите основные типы морфогенеза в культуре каллусных тканей.
14. Расскажите об основных этапах соматического эмбриогенеза. Каковы причины его возникновения, и какие условия требуются для его дальнейшего развития?
15. Что такое «искусственные семена»?
16. Как можно индуцировать различные типы органогенеза в культуре каллусных тканей?
17. Расскажите о генетических и эпигенетических основах морфогенеза.
18. Как получают и используют культуру клеточных суспензий?
19. Дайте основные характеристики суспензионной культуры.
20. Охарактеризуйте культуру одиночных клеток.
21. Какие ферменты используют для культивирования клеточных суспензий?
22. Какова роль клеточных суспензий в получении веществ вторичного синтеза?
23. Что такое клональное микроразмножение растений?
24. Назовите основные этапы клонального микроразмножения растений.
25. Расскажите о размножении растений методом активации существующих растений меристем. Приведите примеры.
26. Расскажите о размножении растений методом индукции возникновения адвентивных почек непосредственно на первичном экспланте. Приведите примеры.
27. Какова роль гормонов в клональном микроразмножении растений?

28. Перечислите пути оздоровления посадочного материала от вирусов.

29. Как генотип и возраст первичного экспланта влияют на клональное микроразмножение растений?

30. В каких условиях осуществляют микроразмножение растений?

## **10. УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ И ИНФОРМАЦИОННОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ДИСЦИПЛИНЫ**

### **Список основной литературы**

1. Сельскохозяйственная биотехнология и биоинженерия: Учебник / Под ред. В.С. Шевелухи. Изд.4-е, знач. перераб. и доп. – М.: ЛЕНАНД, 2015. – 704 с.

### **Список дополнительной литературы**

1. Глазко В.И. Толковый словарь терминов по общей и молекулярной биологии, общей и прикладной генетике, селекции, ДНК-технологии и биоинформатике. В 2т. Т.1. А-О/ В.И. Глазко, Г.В. Глазко – Москва: ИКЦ «Академкнига», изд-во «Медкнига», 2008. – 671 с.

2. Глазко В.И. Толковый словарь терминов по общей и молекулярной биологии, общей и прикладной генетике, селекции, ДНК-технологии и биоинформатике. В 2т. Т.2. П-Я/ В.И. Глазко, Г.В. Глазко – Москва: ИКЦ «Академкнига», изд-во «Медкнига», 2008. –530 с.

3. Калашникова Е.А. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии/ Е.А.Калашникова, Е.З. Кочиева, О.Ю. Миронова. – М.: КолосС, 2006. – 142 с.

4. Щелкунов С.Н. Генетическая инженерия. – Новосибирск: Сиб. унив, изд-во, 2004.- 496 с.

## 11. БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р.Г. Бутенко. - М.-.ФБК-ПРЕСС, 1999
2. Бутенко Р.Г. Клеточная инженерия. Биотехнология, 3 книга / Р.Г. Бутенко, М.В. Гусев, А.Ф. Киркин и др. — М.: Высшая школа, 1987.
3. Глеба Ю.Ю., Сытник К. М. Слияние протопластов и генетическое конструирование высших растений / Ю.Ю. Глеба, К.М. Сытник. — Киев: Наукова думка, 1982.
4. Калашникова Е. А. Получение посадочного материала древесных, цветочных и травянистых растений с использованием методов биотехнологии / Е. А. Калашникова, А. Р. Родин.— М: Изд-во МГУЛ, 2004.
5. Калинин Ф. Л. и др. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин и др.— Киев: Наукова думка, 1980.
6. Калинин Ф.Л. Технология микрклонального размножения растений / Ф.Л Калинин, Г.П. Кушнир, В.В. Срнацкая – Киев: Наукова думка, 1992.
7. Катаева Н.В. Клональное микроразмножение растений / Н.В. Катаева, Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1983.
8. Першина Л.А. Основные методы культивирования *in vitro* в биотехнологии растений / Л.А. Першина. –Новосиб.гос. ун-т. Новосибирск, 2005. – 142 с.
9. Калашникова Е.А. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии/ Е.А. Калашникова, Е.З. Кочиева, О.Ю. Миронова. – М.: КолосС, 2006. – 144 с.

## СОДЕРЖАНИЕ

1. Цели и задачи дисциплины.....	3
2. Требования к результатам освоения дисциплины.....	4
3. Тема 1. Источники питания растений в условиях <i>in vitro</i> .....	5
4. Тема 2. Техника введения в культуру <i>in vitro</i> и культивирование изолированных клеток и тканей растений.....	22
5. Тема 3. Культура каллусных тканей.....	34
6. Тема 4. Вторичная дифференцировка и морфогенез в культуре каллусных тканей. получение растений- регенерантов.....	41
7. Тема 5. Культура клеточных суспензий.....	48
8. Тема 6. Клональное микроразмножение растений.....	54
9. Контрольные вопросы и задания.....	60
10. Учебно-методическое и информационное обеспечение дисциплины.....	62
11. Библиографический список.....	63



Составитель  
Кондратьева Инесса Витальевна

**Основы сельскохозяйственной биотехнологии**

Методические указания  
для практических занятий и самостоятельной работы

Печатается в авторской редакции

Подписано в печать ..... 2015 г. Агрономический факультет  
Формат 60х84 1/16. Объем 8,0 усл. печ. л.  
Бумага офсетная.

---

Отпечатано на агрономическом факультете  
Новосибирского государственного аграрного университета  
630039, Новосибирск, ул. Добролюбова, 160, каб. 333