

**КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра физиологии и биохимии растений

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ

Учебно-методическое пособие

Казань – 2012

УДК 581.1

*Печатается по решению Редакционно-издательского совета ФГАОУВПО
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»*

*учебно-методической комиссии Института фундаментальной
медицины и биологии
Протокол № 2 от 4 июня 2012 г.*

*заседания кафедры физиологии и биохимии растений
Протокол № 2 от 23 мая 2012 г.*

Составители:

докт. биол. наук, проф. О.А. Тимофеева
канд. биол. наук, ст. преподаватель Ю.Ю. Невмержицкая

Рецензенты

канд. биол. наук, доц. Э.В. Бабынин

Клональное микроразмножение растений: Учебно-методическое пособие / О.А. Тимофеева, Ю.Ю. Невмержицкая. – Казань: Казанский университет, 2012. – 56 с.

Учебно-методическое пособие включает в себя обобщенный материал по одному из разделов курса «Агрофитобиотехнология». В пособии рассматривается биотехнология клонального микроразмножения растений, позволяющая многократно увеличить коэффициент вегетативного размножения и получать оздоровленный от вирусов посадочный материал. Пособие предназначено для студентов, бакалавров и магистрантов, изучающих физиологию и биотехнологию растений.

© Казанский (Приволжский) федеральный университет, 2012
Тимофеева О.А., Невмержицкая Ю.Ю.

Клональное микроразмножение

Одно из существенных препятствий на пути внедрения нового сорта в практику – невозможность получения большого количества семян или посадочного материала для вегетативного размножения. Это препятствие устраняется с помощью биотехнологии, которая предлагает селекционерам эффективный и быстрый метод микроразмножения растений. Изучение процесса экспериментального морфогенеза *in vitro* на всех уровнях организации – от отдельной клетки до верхушки побега привело к созданию технологии клонального микроразмножения растений, которая в большинстве стран стала уже коммерческой.

Клональное микроразмножение – массовое бесполое размножение растений в культуре клеток и тканей, при котором возникшие формы растений генетически идентичны исходному экземпляру. Очень важно, что посадочный материал, получаемый этим методом, генетически идентичен давшему ему начало растению, он возникает из соматических клеток растений. При половом размножении потомство развивается из зиготы, образованной в результате слияния половых клеток двух разных особей. Эта зигота содержит гены как отцовского, так и материнского организма, поэтому потомство, возникающее в ходе полового размножения, не идентично одному какому-то родителю, а несет наследственные задатки обоих родителей.

Преимущества клонального микроразмножения в сравнении с традиционными методами:

- получение генетически однородного посадочного материала;
- оздоровление растений от грибных и бактериальных патогенов, вирусных, микоплазменных и нематодных инфекций;
- высокий коэффициент размножения: при клональном микроразмножении можно получить 100 000-1 000 000 клонов в год, тогда как при обычном – всего 5-100 за тот же срок;
- сокращение продолжительности селекционного процесса;
- размножение растений, трудно размножаемых традиционными способами;
- возможность проведения работ в течение года и экономия площадей, необходимых для выращивания посадочного материала.

В соответствии с количеством продукции технологии размножения *in vitro* можно разделить на мелкомасштабные и крупномасштабные. Это деление связано с целями и областями применения.

Клональное микроразмножение используют:

- для быстрого получения больших количеств заведомо безвирусного материала (в основе этой технологии лежит метод, известный как культура верхушечных меристематических тканей, это крупномасштабная технология);

- в селекции для поддержания и размножения небольшого числа отдельных генотипов (не требует больших масштабов);

- для быстрого размножения новых выведенных сортов (до нескольких тысяч растений в течение месяцев, тогда как при использовании традиционных методов уходит несколько лет);

- для размножения древесных растений, разведение и селекция которых осуществляется медленно вследствие длительности или отсутствия вегетативного размножения (многие из этих видов с большим трудом поддаются вегетативному размножению, а в некоторых случаях, например, для однодольных пальм и некоторых пород лесных деревьев, обычное вегетативное размножение вообще невозможно);

- для поддержания гетерозисных гибридов или других гетерозигот, расщепляющихся при скрещивании растений;

- для сохранения редких и исчезающих видов, например, женьшень, ареал которого находится на Дальнем Востоке (Китай, Корея, Россия), сохранился только в Китае на границе с Россией и в 3 районах России в количестве, достаточном для его спасения как вида.

Основоположителем клонального микроразмножения является французский ученый Жорж Морель. В 1960 г. он разработал этот метод для орхидей. В качестве экспланта Ж. Морель использовал верхушку цимбидиума (сем. орхидные), состоящую из конуса нарастания и двух-трех листовых зачатков, из которых при определенных условиях появлялись сферические образования – протокормы (рис.1). Сформировавшиеся протокормы можно было делить и затем культивировать самостоятельно на вновь приготовленной питательной среде до образования листовых примордиев и корней. В результате им было обнаружено, что этот процесс бесконечен и можно получить в большом количестве высококачественный и генетически однородный, безвирусный посадочный материал.

В нашей стране работы по клональному микроразмножению были начаты в 60-х годах в лаборатории культуры тканей и морфогенеза

Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Под руководством профессора Р.Г. Бутенко были изучены условия микроразмножения картофеля, сахарной свеклы, гвоздики, герберы, фрезии и некоторых других растений, предложены промышленные технологии микроразмножения.

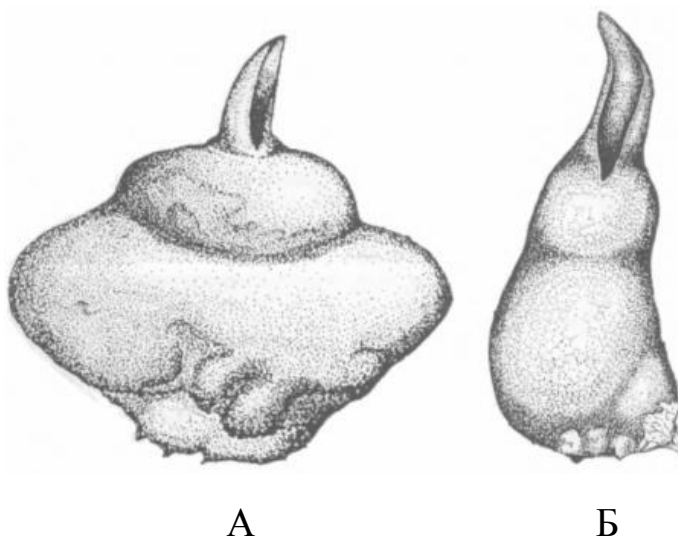


Рис.1 Внешний вид протокормов: А – эпифит *Laelia sincorana* Schltr.; Б - литофит *Laelia iundii* Rchb.f. et Warm.

Типы клонального микроразмножения

Клональное микроразмножение можно производить разными способами. Основные типы клонального микроразмножения:

- подавление апикального доминирования и развитие пазушных почек;
- микрочеренкование;
- образование микроклубней, микролуковиц;
- индукция возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта;
- получение каллусной ткани с последующей индукцией органогенеза или эмбриоидогенеза.

Размножение пазушными побегами. Большая часть высших растений обладает промежуточным типом роста, при котором в пазухах листьев находятся дополнительные меристематические ткани, способные сформироваться в побег, идентичный главному.

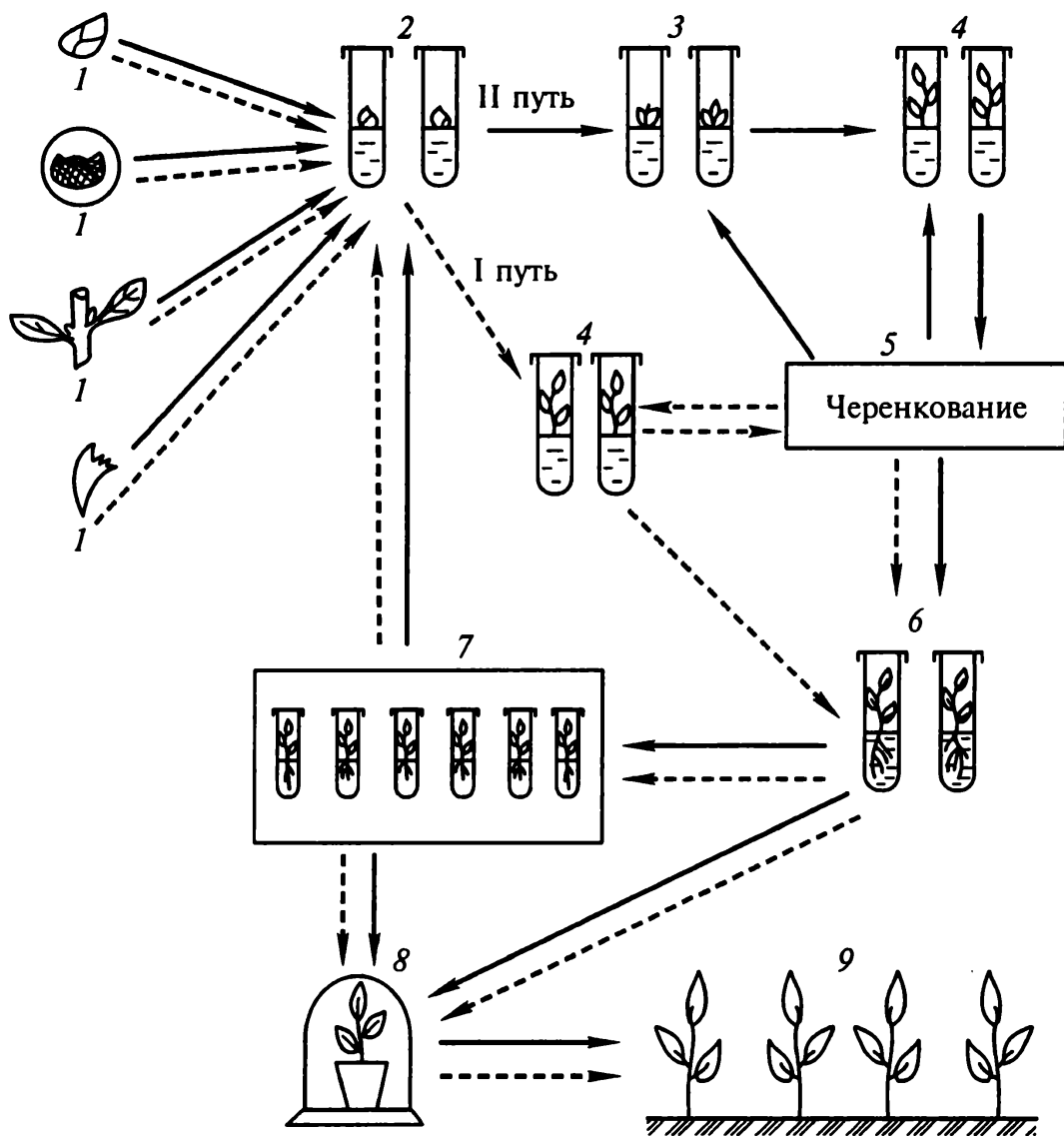


Рис. 2. Схема клонального микроразмножения растений методом активации развития существующих меристем (I путь), индукции возникновения адвентивных почек на экспланте (II путь): 1 – выбор исходного экспланта; 2 – получение стерильной культуры; 3 – образование адвентивных почек непосредственно на первичном экспланте; 4 – рост почек и формирование микропобегов; 5 – размножение микропобегов (черенкование); 7 – депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре; 8 – перевод растений в тепличные условия; 9 – высадка растений-регенерантов в почву.

В соответствии с типом ветвления, характерным для данного вида растений, развивается ограниченное число пазушных меристематических тканей. Развитие большинства из них заторможено

благодаря явлению апикального доминирования (подавление роста боковых почек за счет преимущественного развития верхушечных). В основе этого способа клонального микроразмножения лежит снятие апикального доминирования и активация пазушных меристем. Это может быть достигнуто удалением верхушечной меристемы стебля и последующим микрочеренкованием побега *in vitro* на безгормональной среде (рис. 3). Хотя апикальное доминирование, по-видимому, контролируется несколькими гормональными системами, у многих растений рост пазушных побегов зависит, в конечном счете, от снабжения меристематических тканей цитокининами. Снятие апикального доминирования возможно также путем введения в среду веществ с цитокининовой активностью (рис. 3), что приводит к формированию побегов с относительно укороченным междоузлием, при этом пазушные побеги и меристематические бугорки дают начало новым побегам.

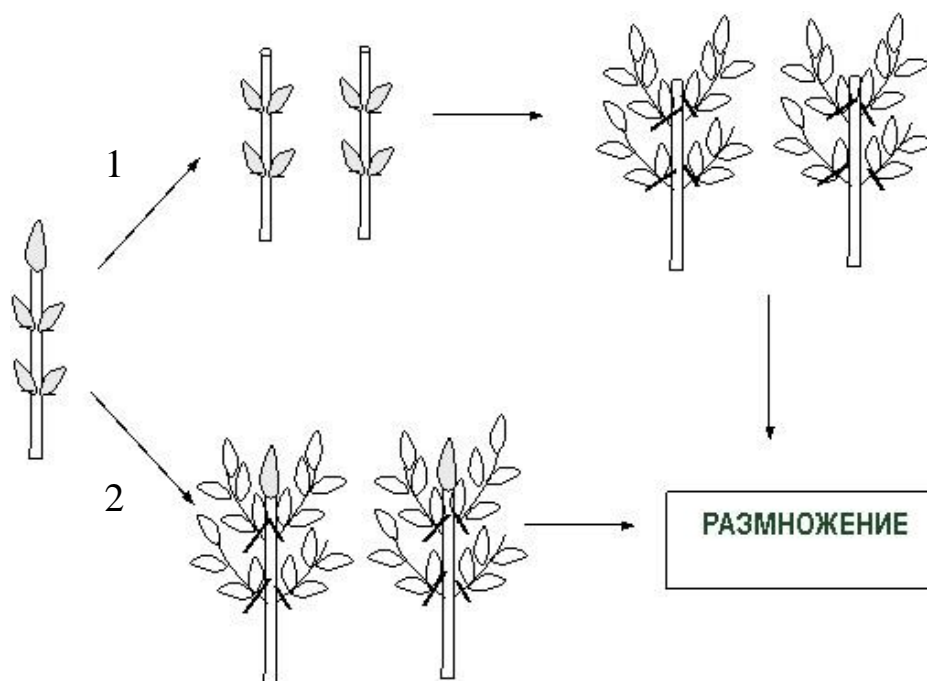


Рис.3. Схема размножения растений методом активации пазушных меристем: 1 – путем удаления верхушечной меристемы; 2 – добавлением гормонов в среду.

Кончики побегов, культивируемые на основной среде, свободной от гормонов, обычно развиваются в одиночные побеги с апикальным доминированием. При культивировании на среде, содержащей цитокинины, главный побег часто вырастает недоразвитым, за ним следуют побеги второго порядка, затем третьего и т.д., образуя быстро

растущий пучок побегов. После того, как такой пучок достаточно развился, его можно разделить на более мелкие пучки с общей корневой системой или на отдельные побеги, способные образовывать при выращивании на свежей среде такие же пучки побегов. При наличии хорошо сбалансированной среды этот процесс, по-видимому, может продолжаться бесконечно. Например, быстро размножающиеся побеги гладиолусов поддерживались в течение 11 лет без заметного физиологического ухудшения.

Скорость, с которой могут образовываться недоразвитые пазушные побеги, зависит от скорости формирования листьев *in vitro*. Последняя варьирует в зависимости от вида растений и пригодности питательной среды. В определенной степени скорость размножения можно контролировать концентрацией цитокинина и размерами используемого сосуда. У разных растений скорость широко варьирует, для хорошо растущих растений она колеблется от пяти до десятикратного увеличения в течение 4 – 8 недель. Например, при размножении герберы верхушку побега помещают на питательную среду, содержащую 4,62 мкМ/л цитокинина. Рост апекса стебля начинается через 7-8 дней после посадки. Вегетативный побег, несущий у основания листья, формируется через 5-6 недель. В основании побега развивается каллус и дифференцируются корни. В пазухах листьев закладываются почки. Внесение цитокинина 1,38 – 4,62 мкМ/л в среду вызывает пробуждение и быстрое развитие боковых почек, которые образуют пазушные побеги второго и третьего порядков. При изолировании и переносе побегов, развившихся из пазушных почек, на среду, содержащую те же концентрации кинетина, наблюдается повторение процесса активации пазушных почек, при этом за 3 – 4 недели образуется 8 – 10 побегов.

БАП (6-бензиламинопурин) в концентрации 2,31 – 13,29 мкМ/л стимулирует развитие пазушных побегов малины, вишни, сливы, яблони. При этом от одной стерильно полученной верхушки побега можно получить несколько тысяч растений в год. Например, при культивировании меристемы малины *in vitro* удастся получить потомство численностью до 50 000 растений, тогда как обычная техника черенкования обеспечивает получение 50 растений в год.

Для получения пазушных побегов в культуру вводят срезанные кончики побегов или придаточные побеги, образованные *in vitro*. Ткань, необходимая для размножения, может быть отсечена от верхушечных

или боковых побегов. Во избежание загрязнений, присутствующих на наружных листьях, ограничивают размер ткани (1 – 5 мм).

Чем больше верхушечный эксплант, тем быстрее он будет расти и тем больше у него шансов выжить. Верхушечный эксплант обычно помещают на среду с низкой концентрацией цитокинина и ауксина. При каждой очередной пересадке уровень цитокинина в среде постепенно повышают до тех пор, пока не будет достигнута максимальная скорость размножения. Если у основания ткани проявляется хоть какая-нибудь тенденция к формированию каллуса, ауксин из среды исключают. Цитокинины почти всегда ингибируют образование корней, поэтому пучки побегов, образовавшиеся в результате очередного цикла выращивания, разделяются легче. При переносе на среду, не содержащую цитокинины, образование корней происходит спонтанно, особенно у однодольных растений.

Центральный вопрос микроразмножения растений – концентрация фитогормонов в среде. В работах Мурасиге, основополагающих по микроразмножению, приводятся данные о высоких концентрациях цитокининов, а также даются готовые рекомендации по составу питательных сред и условий культивирования. Однако очень часто использование высоких концентраций цитокининов с целью получения максимального коэффициента размножения вызывает такие нежелательные для микроразмножения эффекты, как изменение морфологии растений, подавление пролиферации пазушных меристем, уменьшение способности побегов к укоренению.

Использование питательных сред с минимальной концентрацией цитокининов, которая обеспечивает достаточную скорость микроразмножения, а также чередование циклов культивирования на средах с низким уровнем фитогормонов, помогает избежать токсического действия цитокининов, обусловленного их постоянным присутствием в питательной среде.

Размножение микрочеренкованием и микроклубнями. Метод культуры тканей представляет собой микромасштабный и усовершенствованный вариант традиционного черенкования. Асептические добавки и соответствующие питательные добавки позволяют в случае необходимости уменьшить размер экспланта до нескольких миллиметров и увеличить коэффициент размножения. Микрочеренкованием размножают большое количество культур.

Клональное микроразмножение картофеля путем черенкования осуществляется следующим образом. Клубни картофеля проращивают 10-15 дней. За это время на них появляются длинные желтоватого цвета побеги с мелкими недоразвитыми листьями. Такие побеги называются этиолированными, они сохраняют ювенильные свойства. Стебли нарезают на фрагменты, содержащие одну почку, стерилизуют и помещают на питательную среду. Вскоре сегменты стебля, находящиеся в пробирках, образуют растения, которые размножают черенкованием. Для этого растения вынимают из пробирки и нарезают на сегменты с одним листом и пазушной почкой.

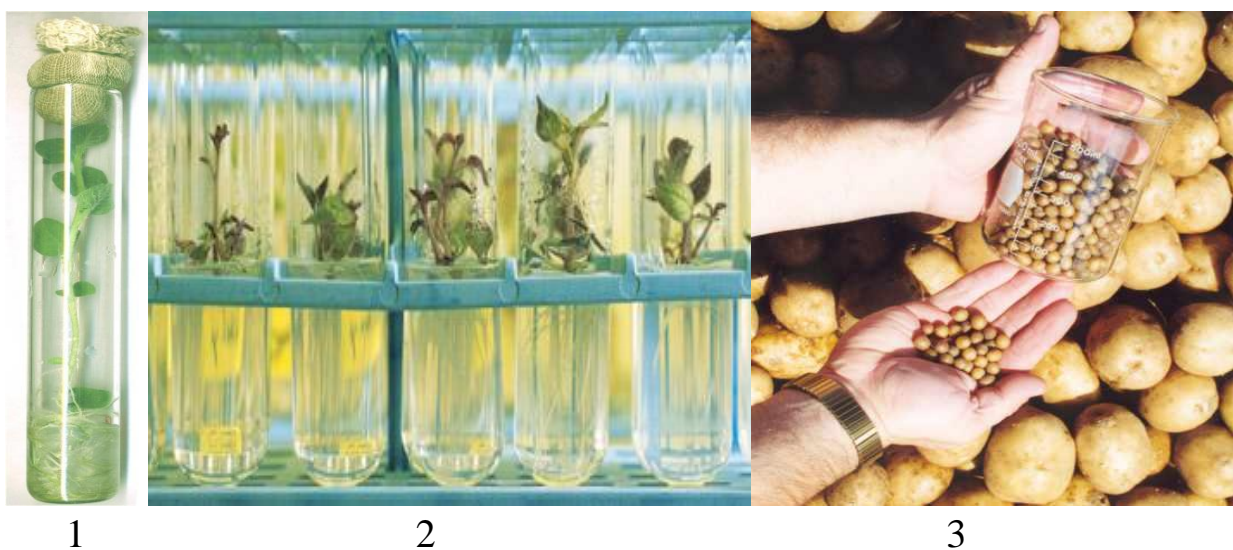


Рис. 4. 1 – микрорастение картофеля; 2 – размножение картофеля *in vitro*; 3 – микроклубни безвирусного картофеля.

Сегменты переносят в пробирки с питательной средой. Из них образуются растеньица, которые можно переносить в почву, где они превращаются в нормальные растения картофеля. Переместив пробирочные растения на среду иного состава и в иные условия освещения можно вызвать образование крошечных клубней (так называемые «микроклубни»).

Данная технология позволяет выращивать большое количество растений в ограниченном пространстве: каждый лоток может содержать до 500 проростков на квадратный метр. В течение шести месяцев отдельный проросток может произвести до 100 000 клонов.

После сбора урожая микроклубни должны храниться при низких температурах. Спустя 45 дней и в течение последующих семи месяцев

они могут быть помещены в более теплую среду для стимулирования прорастания. Из микроклубней выращивают безвирусный семенной картофель обычного размера, который может использоваться в сельском хозяйстве. По мере роста растениям требуется защита от насекомых-вредителей с целью избежания новых инфекционных заболеваний.



Рис. 5. Дифференциация луковичек и микроразмножение *Allium karataviense* Regel.

Размножение придаточными (адвентивными) побегами. Известно множество фактов образования придаточных (адвентивных) побегов на зрелых органах растений, особенно на листьях, стеблях и корнях. Такие явления часто используют в практике при черенковании. Для черенкования можно использовать почти все органы растения: побеги, образующиеся на листьях бегонии и других лекарственных растений, на чешуйках различных луковичных, на кусочках стеблей и корней деревьев, например, яблони. Широкая распространенность в мире растений такого типа репродуктивной регенерации привела к появлению в начале 20 века концепции «тотипотентности» клеток и тканей растений. Успешное использование метода культуры клеток и тканей для получения побегов у большого числа растений подтвердило эту концепцию.

Регенерация придаточных побегов на эксплантах органов может быть получена у большого числа растений. Однако у многих из них такое же размножение может быть с легкостью получено при использовании пазушных побегов, генетически более стабильных. К

сожалению, существует много растений, непригодных для быстрого размножения этим способом, поскольку они слишком медленно формируют придаточные побеги. К таким растениям относятся хвойные и некоторые пальмы, а также различные декоративные и размножающиеся луковицами однодольные растения.

Во многих случаях для размножения придаточными побегами удобнее использовать тот же орган, что и при традиционном размножении, но гораздо моложе. Ткань с большим числом меристематических клеток будет активнее регенерировать. С помощью этого метода были размножены многие луковичные растения (нарциссы, лилии, гиацинты, гладиолусы, тюльпаны) из луковичных чешуй, сегментов базальной части донца луковицы, эксплантов листьев; представители рода *Brassica* (капуста цветная, кочанная, брюссельская, листовая, брокколи) из сегментов гипокотыля, семядолей, листьев; лук, чеснок – из верхушечной меристемы, ткани донца луковиц; томаты – из апикальных или пазушных меристем; салат цикорный – из сегментов листовых пластинок; петуния – из сегментов корней; глоксиния, фиалки – из сегментов листовых пластинок.

Несомненный интерес вызывает происхождение адвентивных побегов. К сожалению, в большинстве работ по клональному микроразмножению центральный вопрос: какие ткани принимают участие в дифференциации адвентивных побегов, остается без четкого ответа. Логично предположить, что развитие адвентивных побегов может осуществляться за счет меристематических тканей. Хорошо известно, что в растении наряду с апикальными и пазушными меристемами корня и стебля имеются боковые, интеркалярные меристемы, а также меристемы органов с ограниченным ростом. При регенерации побегов меристематические ткани, выполняющие строго определенные функции в растительном организме реорганизуются, при этом восстанавливаются их первоначальные функции. Например, у каланхоэ по краям мясистых листьев имеются меристематические клетки, из которых развиваются почки.

Вместе с тем адвентивные побеги могут развиваться и не из меристематических тканей. Французской исследовательницей Гран Тан Ван был проведен интересный эксперимент по культивированию эксплантов, состоящих из эпидермиса и двух-трех субэпидермальных слоев. По ее данным регенерация почек и корней происходила непосредственно из клеток эпидермиса.

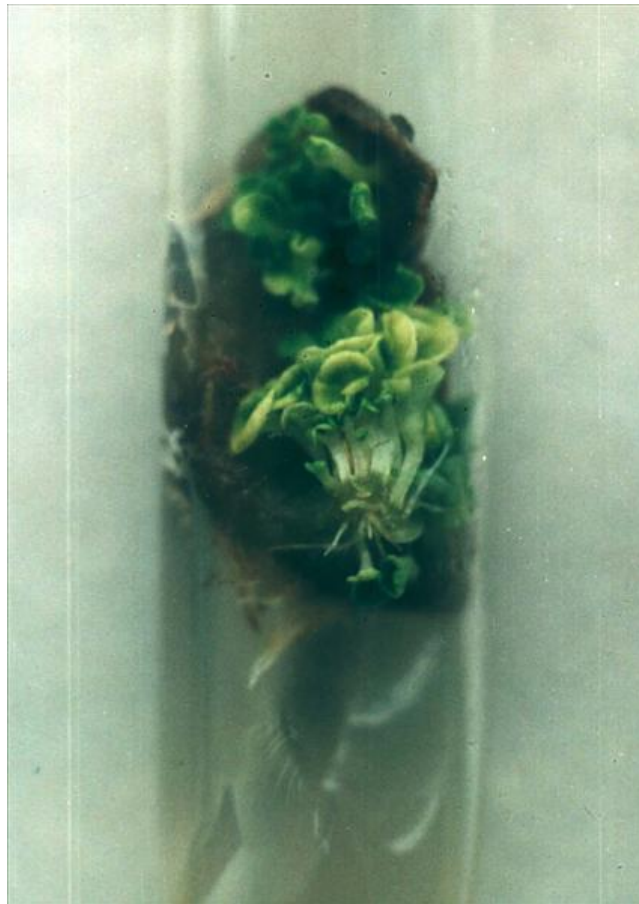


Рис. 6. Адвентивные побеги на экспланте сенполии.

Позднее тот же автор осуществила культивирование отдельных клеточных слоев ткани стебля, а именно эпидермиса, субэпидермальных тканей, эпидермиса совместно с подлежащими тканями, стебля без эпидермиса, изолированного эпидермиса, а затем совмещенного с субэпидермальной тканью непосредственно или через тонкий слой агара. Оказалось, что дифференциация почек и корней индуцировалась в эпидермисе только в случае совместного культивирования его с подлежащей тканью, независимо от того, был ли эпидермис предварительно изолирован, а затем совмещен с субэпидермальной тканью или нет. При культивировании только субэпидермальных тканей или стебля без эпидермиса формировались корни. Изолированный эпидермис был не способен к органогенезу. На сегментах базальной части донца луковиц тюльпанов были проведены цитологические исследования, которые показали, что адвентивные побеги формировались из поверхностных слоев меристематических клеток, прилегающих к донцу. Для растений глоксинии процесс

формирования адвентивных побегов происходил в субэпидермальных клеточных слоях листовых пластинок.

Таким образом, данный метод микроразмножения основывается на двух принципиально различных явлениях:

1. возникновении почек из существующих меристем;
2. редифференциация специализированных клеток, образование меристематических очагов и дифференциация стеблевых почек.

В последнем случае адвентивные почки обычно возникают из эпидермиса или субэпидермальных тканей. Различие между этими процессами имеет большое значение, т.к. меристематическое происхождение растений гарантирует им генетическую идентичность родительским формам.

Наиболее эффективен метод размножения придаточными побегами для растений, образующих луковицы и клубнелуковицы. Большинство луковичных в природе размножается очень медленно. Для ускорения их размножения используют различные традиционные подходы, такие как разрезание луковиц, размножение чешуйками и выщепление луковичной почки. Метод культуры клеток и тканей позволяет значительно увеличить коэффициент размножения растений из таких чешуек или луковичек как с помощью интенсивной регенерации эксплантов меньшего размера, так и с помощью продолжительного циклического выращивания. Хотя *in vitro* побегообразование может быть индуцировано из различных органов, наибольшей способностью к регенерации обладают ткани основания листьев и чешуй, расположенных непосредственно под донцем луковицы. *In vitro* возникновение побегов индуцируется на эксплантах из чешуй или листьев на средах, содержащих ауксин или ауксин и цитокинин. Побеги, развивающиеся *in vitro* из различных луковичных растений, могут быть разделены и использованы для получения таких же побегов.

У некоторых луковичных, например, ириса, в промежутках между молодыми листьями и между чешуями появляются как пазушные, так и придаточные побеги. У других растений (нарцисс, гиацинт, левкой) сильно выражено апикальное доминирование, и поэтому для получения большого числа придаточных побегов необходимо расщепить верхушку основного побега. Это достигается с помощью 2-х вертикальных надрезов под прямым углом к горизонтальной плоскости. Позднее эта же процедура повторяется с каждым из пучков придаточных побегов, вырастающих между усеченными чешуями.

При культивировании сегментов клубнелуковицы фрезии на среде, содержащей цитокинины, происходит развитие придаточных побегов из тканей клубнелуковицы. При этом адвентивные побеги развиваются в количестве 1–3 в каждой пробирке. Одновременно закладывается множество почек. Однако для нормального роста последних необходимо удалить основной побег и перенести сегмент клубнелуковицы на свежую среду.

Образование адвентивных побегов в основании цветочной почки также является методом клонального размножения фрезии. Цветочная почка фрезии быстро распускается, затем цветок засыхает, а из каждого экспланта в течение 8–16 недель образуется от одного до трех побегов, а также дифференцируются многочисленные стеблевые меристемы. Культивируя изолированные сегменты соцветий, можно индуцировать образование адвентивных побегов у герберы, спатифиллума и ряда других культур. Необходимым условием для этого является введение в среду цитокинина в концентрации 4–45 мкМ/л.

Побеги из каллуса. В основе этого метода микроразмножения лежит использование способности клеток экспланта дедифференцироваться и образовывать каллус. При изменении концентрации фитогормонов из каллусов можно регенерировать побеги или эмбриоиды. Массовое производство каллуса с последующим образованием побегов можно было бы считать идеальным методом крупномасштабного размножения, однако в настоящее время существует два серьезных недостатка, ограничивающих использование этого подхода. Способность многих каллусов регенерировать побеги снижается или даже теряется в процессе культивирования и пересадок каллусной ткани. В то же время постепенно возрастает число полиплоидных, анеуплоидных и других генетически измененных клеток, а, следовательно, и вероятность образования из каллуса растений, отличающихся от исходной родительской формы.

Причины цитогенетической изменчивости культивируемых клеток разнообразны, механизм ее до сих пор не ясен, несмотря на широкую распространенность этого явления. При всем при этом можно выделить ряд факторов, ответственных за генетическую изменчивость в культуре клеток:

- нарушение коррелятивных связей при выделении экспланта;
- действие компонентов среды;

- влияние продуктов метаболизма, накапливающихся в среде;
- гетерогенность исходного материала и селекция клеток определенного типа.

Согласно концепции Торри, кинетин индуцирует деление преимущественно полиплоидных клеток гетерогенного экспланта. Полиплоидные клетки активно пролиферируют, следствием чего является их возрастающее доминирование в популяции. Это суждение нашло подтверждение в работах Кунаха и Алпатовой, показавших, что длительное применение экзогенных регуляторов роста, аналогичных цитокининам, приводит к увеличению пloidности и формированию миксоплоидных клеток в культуре тканей гаплопаппуса. Важно, что полиплоидизация длительно пассируемых штаммов гаплопаппуса при выращивании их на среде без фитогормонов значительно замедляется.

Цитогенетическая изменчивость культивируемых клеток связана с присутствием в питательной среде и ауксинов, особенно 2,4-Д, которые способны индуцировать эндоредупликацию или эндомитоз диплоидных ядер растительных клеток *in vitro*.

Регенерация растений из гетерогенных клеток в ряде случаев приводит к получению растений с измененной морфологией: неправильным жилкованием листьев, нарушенным расположением листьев, низкорослостью, уродливостью и пониженной жизнеспособностью.

Так, растения пеларгонии, регенерированные из каллуса, отличаются друг от друга по величине, морфологии листа и цветка. Изменчивость растений зависит от возраста каллуса и его происхождения. Из стеблевого каллуса дифференцируются нормальные растения, а из каллуса корневого происхождения формируются растения с внешней патологией. Предполагается, что эти изменения связаны с хромосомными aberrациями и генными мутациями.

Однако было бы преувеличением возложить на цитогенетическую изменчивость всю ответственность за регенерацию аномальных растений. Совсем не исключается роль модификационной изменчивости. Накопилось немало данных, свидетельствующих о том, что нарушения в росте исчезают при изменении условий культивирования. Например, полученные в культуре каллусных клеток морфологические отклонения у растений картофеля (карликовость, продолговатые листья) исчезали по мере черенкования этих растений.

Несомненно, что причиной этих нарушений является неадекватность культивирования. Поэтому каждый раз, когда наблюдается регенерация аномальных растений в каллусе, должен быть решен вопрос: имеют ли эти нарушения генетическую природу или являются метаморфозом.

Сокращая период каллусного роста до 3 – 4-х пассажей, удаляя старые и некротические участки каллусной ткани, применяя низкие концентрации фитогормонов, можно значительно уменьшить риск получения неоднородного потомства.

Другой недостаток этого метода клонального микроразмножения, о котором говорилось выше, это потеря морфогенетического потенциала у длительно культивируемых тканей и клеток *in vitro*. Каллусные клетки в длительной культуре часто не способны к регенерации побегов и корней или к дифференциации эмбриоидов. В литературе обсуждается вопрос о причинах этого явления. Господствуют две точки зрения. Согласно первой (генетическая концепция), потеря морфогенетического потенциала обусловлена цитогенетическими изменениями в культивируемых клетках (полиплоидизация, анеуплоидизация, хромосомные aberrации, генные мутации). Генетически измененные клетки, обладая селективным преимуществом в культуре *in vitro*, постепенно вытесняют нормальные, способные к морфогенезу клетки.

Вторая точка зрения заключается в признании способности культивируемых клеток к морфогенезу, которая не реализуется из-за обратимых физиологических или эпигенетических изменений, происходящих в клетках. В пользу этого говорят эксперименты, в которых удалось регенерировать растения из старого анеуплоидного каллуса табака. По данным других авторов эмбриогенный потенциал длительно культивируемого каллуса моркови можно восстановить введением в питательную среду кинетина или обработкой культивируемых тканей холодом.

Оставляя в стороне вопрос о конкретных причинах уменьшения морфогенетического потенциала культивируемых клеток, следует отметить несомненную связь этого явления с видовой принадлежностью растений. Так, если каллус большинства злаковых растений теряет способность к морфогенезу в течение нескольких первых месяцев культивирования, то каллус табака сохраняет способность к формированию органов в течение 4-х лет.

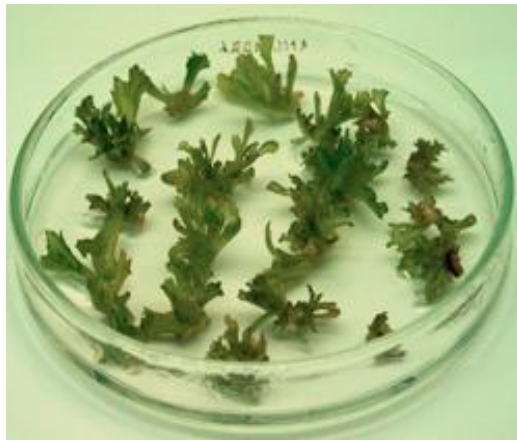


Рис. 7. Образование побегов из каллусной ткани на питательной среде.

Несмотря на цитогенетическую изменчивость каллусных клеток и потерю ими в процессе культивирования способности к морфогенезу, пролиферация каллусов с последующей регенерацией из него побегов является эффективным и в ряде случаев единственно возможным способом размножения растений в культуре тканей. Несомненно, этот метод можно применять только к тем растениям, для которых показана генетическая стабильность каллусной ткани, или в том случае, если вариабельность между растениями-регенерантами не превышает уровень естественной изменчивости. Согласно данным литературы, регенерация побегов каллуса амариллиса, драцены, томатов обычно приводит к формированию нормальных растений.

Большого внимания в этом отношении заслуживают работы по микроразмножению с использованием суспензионной культуры клеток растений. Согласно данным Дарзану стодневный каллус американского вяза необходимо перевести в суспензионную культуру, выращивать суспензию в течение нескольких месяцев и затем вновь перенести на агаризованную среду для образования каллуса. Возникшие в каллусе растения морфологически не отличаются от проростков американского вяза.

По-видимому, идеальный каллус должен удовлетворять следующим требованиям:

1. содержать генетически стабильные диплоидные меристематические клетки, аналогичные клеткам стеблевого апекса, и обладать способностью постоянно размножаться;

2. образовывать большое число растений-регенерантов после соответствующих изменений компонентов питательной среды.

Необходимым условием сохранения тотипотентности каллуса и регенерации из него растений только нужного типа является сохранение определенного соотношения диплоидных меристематических клеток ко все возрастающему числу беспорядочно дифференцирующихся клеток, неспособных образовывать растения.

Эмбриоидогенез из каллуса или суспензии клеток, по-видимому, очень перспективен, и многие исследователи используют этот подход при клональном микроразмножении. В настоящее время воспроизведение растений через эмбриоидогенез получено для целого ряда важных сельскохозяйственных культур: кукурузы, ржи, проса, риса, сахарного тростника и др. Однако практическое использование этого метода ограничено незначительным числом видов растений

Получение безвирусного посадочного материала

Растения, размноженные с помощью культуры пазушных побегов и полученные из верхушек побегов длиной 1 – 2 мм, почти всегда заражены вирусами, присутствующими в материнском растении. Вирусы поражают растения различных семейств, вызывают около 300 заболеваний сельскохозяйственных культур, тем самым снижая урожай и его качество. Особенно большой вред вирусные инфекции наносят растениям семейства пасленовых. Вирусные болезни растений легко передаются потомству при вегетативном размножении. Борьба с этими болезнями осложняется тем, что вирусы – облигатные паразиты, и их уничтожение сопровождается гибелью клеток хозяина. Для борьбы с вирусными инфекциями разработана целая система мероприятий, которые носят профилактический характер, поскольку вылечить пораженные вирусом растения невозможно. К ним относится выращивание устойчивых к вирусной инфекции сортов. Однако следует иметь в виду, что в устойчивых растениях вирус, не заявляя о себе появлением характерных симптомов, может длительное время существовать в скрытом состоянии. Кроме того выращивание неустойчивых растений рядом с устойчивыми чревато нежелательными последствиями – насекомые могут перенести вирусы на последние.

Среди мероприятий, ограничивающих распространение вирусной инфекции – использование посадочного материала, полученного от здоровых растений. Для удаления вирусов используют метод,

известный как культура верхушечных меристематических тканей. Еще в 1934 г. основоположник метода Уайт указал, что вирусы отсутствуют в кончиках корней у зараженных растений. Основываясь на этих фактах, французские ученые Морель и Мартин предложили метод получения оздоровленных (безвирусных) растений из культивируемых на питательной среде апикальных меристем. Согласно этому методу, культивируют очень маленький кусочек (0,3 – 0,5 мм) верхушечной ткани – обычно это меристематическая ткань и 1-2 листовых примордия. По-видимому, вирусы не могут проникать в стеблевой апекс с такой же легкостью, как в другие ткани, или, в случае проникновения их, репликация подавляется реакцией растения на травму, вызванную отсечением верхушки. Однако не исключены и какие-то другие факторы. В целом, чем меньше размеры культивируемой верхушечной ткани, тем выше шансы регенерировать растение, свободное от вирусов, хотя при этом скорость роста и жизнеспособность эксплантов соответственно понижены.

Для снижения инфицированности материнское растение перед изоляцией верхушечной меристематической ткани подвергают тепловой температурной обработке (6 – 12 недель при 30-40⁰С). Метод термотерапии применяется как в условиях *in vivo*, так и *in vitro*. Для объяснения механизма освобождения от вирусов в процессе термотерапии существуют различные гипотезы. Согласно одной из них, высокие температуры воздействуют непосредственно на вирусные частицы через их рибонуклеиновую кислоту и белковую оболочку, вызывая физическое разрушение и лишая вирусные частицы инфекционности. Вторая гипотеза состоит в том, что высокая температура действует на вирусы через метаболизм растений. Под влиянием высоких температур нарушается равновесие между синтезом и деградацией вирусных частиц. Если преобладает синтез, то концентрация вируса в зараженных тканях растет, и наоборот. Растения, подвергающиеся термотерапии, помещают в специальные термокамеры, где в течение первой недели повышают температуру от 25⁰С до 37⁰С путем ежедневного повышения температуры на 2⁰С. Очень важно при термотерапии создавать и поддерживать на протяжении всего процесса оптимальный режим: температуру 37⁰С, освещенность лампами дневного света 5000 лк, фотопериод 14-16 ч при относительной влажности в термокамере 90%.

Продолжительность термотерапии зависит от состава вируса и его термостойкости. Например, для гвоздики достаточно 10 – 12-недельного воздействия теплом, а для освобождения хризантем от Б-вируса этот период длится 12 и более недель. Однако существуют растения, такие как цимбидиум, розы и другие, рост которых угнетается в результате длительной термотерапии *in vitro*. Для таких растений целесообразно проводить термотерапию растений-регенерантов *in vitro*.

Помимо влияния термотерапии на снижение инфицированности растений, выявлен положительный эффект высоких температур на точку роста и процессы морфогенеза некоторых цветочных культур (гвоздики, хризантемы, фрезии) в условиях *in vitro*. Применение термотерапии позволяет увеличить коэффициент размножения на 50 - 60%, повысить адаптацию пробирочных растений к почвенным условиям, а также получить более высокий процент безвирусных маточных растений.

Применение термотерапии в сочетании с меристемной культурой позволяет оздоровить более 70% растений-регенерантов хмеля от вирусного хлороза, 90% растений земляники, 25% черной и красной смородины, 50% малины, более 80% картофеля. Проверку растений на наличие вирусов, как правило, проводят с помощью иммуноферментного анализа, электронной микроскопии и травянистых растений-индикаторов.

Другой способ, применяемый для освобождения растений от вирусов – хемотерапия. Он заключается в добавлении в питательную среду, на которой культивируют апикальные меристемы, аналога гуанозина – 1β-Д-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3карбоксимид (вирозол) в концентрации 20-50 мг/л. Этот противовирусный препарат обладает широким спектром действия. При использовании вирозола в культуральной среде процент безвирусных растений увеличивается до 80-100% по сравнению с 0-41% в контроле (для ряда обычных для этих растений вирусов). Положительные результаты хемотерапии были получены для сливы, черешни, малины, некоторых цветочных и других растений.

В настоящее время метод культуры верхушечных меристематических тканей широко применяют для оздоровления многих плодовых культур. Например, сорт картофеля Бель-де-фонтен, который практически исчез в результате заражения вирусами, был

возрожден из здоровой меристемы, полученной из зараженного растения и культивируемой *in vitro*.

Этапы и техника культивирования растительных тканей на разных этапах клонального микроразмножения

Процесс микроразмножения состоит из ряда последовательных операций, каждая из которых имеет свою специфику. Этапы клонального микроразмножения:

- отбор подходящих эксплантов, их стерилизация и перенос на питательную среду;
- собственно микроразмножение;
- укоренение побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям;
- выращивание растений в условиях теплицы и подготовка их к посадке в поле.

I этап. При выборе экспланта необходимо учитывать как вид растения, так и метод микроразмножения, который будет использоваться. На процесс получения микроклонов влияет сезон года и фаза развития родительского растения, реакция экспланта во многом зависит от того, из какого органа растения он взят. Хотя большинство растений хорошо поддаются введению в культуру в фазе активного роста, экспланты некоторых растений образуют побеги лишь в фазе покоя. Из эксплантов чешуек луковиц лилии легко получить регенерацию деток, если их взять весной или осенью, а не в летний или зимний период. Апикальная меристема гвоздики, изолированная в марте, дает наибольший процент жизнеспособных растений. Чем меньше абсолютный возраст растений, тем интенсивнее идет рост побегов. Эта зависимость особенно ярко выражена у древесных растений.

Говоря об изолировании экспланта и его стерилизации нельзя обойти вопрос специальной подготовки родительских растений – доноров экспланта, что оказывает влияние на успех стерилизации.

Для получения стерильной культуры розеточного растения рудбекии его целесообразно с короткого дня на несколько дней перенести в условия длинного дня для вытягивания стебля. Это приводит к образованию розетки листьев целиком над землей на

стеблевых частях растений. В этом случае применение обычных стерилизующих растворов дает хорошие результаты.

Гербера – розеточное растение, у которого укороченный стебель вместе с апексом погружен в землю. К тому же верхушка побега покрыта многочисленными волосками, между которыми накапливаются мелкие частицы земли. Все это затрудняет стерилизацию общепринятыми мерами. И только изменив способ посадки материнских растений, удалось получить удовлетворительные результаты. Материнские растения должны быть посажены так, чтобы точка роста стебля была приподнята над землей.

Деберг и Мейн рекомендуют выделить специальный нулевой этап в микроразмножении, целью которого должна стать подготовка растений к изолированию эксплантов.

На нулевом этапе растения следует выращивать в теплицах при невысокой влажности воздуха и с ограниченным поливом. Вода должна поступать в почву через специальные капилляры, попадая непосредственно к корню. Необходимо избегать полива сверху. Эти условия не совсем благоприятны для роста растений, но при этом резко уменьшается количество инфицированных растений. За несколько недель до изолирования экспланта растения обрабатывают ядохимикатами, а ту его часть, которая будет служить эксплантом, покрывают марлевым мешочком, чтобы избежать переноса патогенов насекомыми.

Химический состав питательной среды, ее физические свойства должны соответствовать тем задачам, которые выполняет среда на каждом этапе микроразмножения. На первом этапе в состав питательной среды часто вводят антиоксиданты (цистеин, глутатион, аскорбиновая кислота), которые предупреждают действие гидролитических ферментов и гибель высаженных эксплантов. Мейер предлагает все операции по изолированию экспланта проводить на фильтровальной бумаге, пропитанной аскорбиновой кислотой, а во время подготовки эксплантов и в процессе их пересадок погружать ткани в раствор, содержащий антиоксиданты.

Добавление активированного угля благотворно сказывается на росте побегов. Активированный уголь адсорбирует выделяемые эксплантом токсические вещества. В то же время уголь адсорбирует из среды и биологически активные вещества, что существенно уменьшает их исходную концентрацию.



1



2



3



4



5



6



7



8

Рис.8. Микрклональное размножение роз. 1 – растения розы; 2-3 – черенкование; 4 – стерилизация эксплантов; 5 – образование побегов; 6 – ризогенез микрорастений; 7- высадка микрорастений в горшочки; 8 – поддержание высокой влажности для укоренения и выживания микрорастений в теплице.

Поэтому в среды, содержащие активированный уголь, необходимо вносить более высокие концентрации фитогормонов.

Важность первого этапа микроразмножения обусловлена тем, что от получения первичной культуры тканей или органов зависит весь дальнейший процесс размножения. На первом этапе питательные среды содержат высокие концентрации минеральных солей, углеводов, витамины, цитокинины и ауксины, иногда гиббереллины.

II этап – собственно размножение. В некоторых случаях состав питательной среды на втором этапе (собственно размножение) остается прежним. В остальных случаях ее обогащают гормонами, способными индуцировать морфогенетические реакции *in vitro*.

В большинстве случаев исследователи отдают предпочтение среде Мурасиге и Скуга. Регулирование морфогенеза с помощью экзогенных фитогормонов лежит в основе клонального микроразмножения растений. Среди наиболее используемых цитокининов – кинетин, БАП, зеатин, ауксинов – ИУК и НУК в концентрации до 0,5 мг/л.

При культивировании пазушных почек гречихи на средах с различными концентрациями цитокининов наилучший результат был получен при использовании БАП в концентрации 0,5 – 1 мг/л, а также БАП (2,23 мг/л) + ИУК (0,175 мг/л). Интересно, что на среде, содержащей 2,23 мг/л БАП и 0,175 мг/л ИУК развивающиеся побеги имели розеточную форму, их междоузлия не вытягивались, тогда как на средах, содержащих 0,5 мг/л БАП, одновременно с активацией пазушных побегов происходило их вытягивание. Это облегчало выделение единичного побега из пучка и пересадку его при укоренении. Кроме того, побеги, размноженные на среде с 0,5-1 мг/л БАП быстрее формировали корни.

Увеличение концентрации БАП до 1,5 мг/л значительно ингибировало образование пазушных побегов и приводило к появлению мелких уродливых, плохо развитых почек. Понижение концентрации до 0,1 мг/л также ингибировало развитие пазушных побегов и вызывало заложение многочисленных генеративных почек и образование корней в основании черенка. Однако следует отметить, что введение в среду ИУК в небольшой концентрации (2,23 мг/л БАП и 0,175 мг/л ИУК) снимало ингибирующий эффект высокой концентрации БАП и способствовало увеличению выхода пазушных побегов. Причем использование низких концентрации БАП (0,1 – 0,5 мг/л) оказалось

более эффективным для клонального микроразмножения татарской гречихи, чем для посевной.

Люндерган и Джаник установили, что БАП в концентрации 5 мг/л с одной стороны вызывал максимальное развитие пазушных побегов яблони в культуре клеток, но с другой стороны, приводил к появлению уродливых низкорослых побегов. В то же время при концентрации БАП 1 мг/л из почек формировались нормальные побеги, и при этом наблюдали лишь незначительное уменьшение скорости микроразмножения. По данным Попова и Высоцкого при длительном культивировании побегов земляники на средах с высоким содержанием БАП в некоторых случаях происходило формирование пассивных почек, не способных ни к пролиферации пазушных меристем, ни к корнеобразованию. По-видимому, в процессе культивирования побегов в их тканях происходит постепенное накопление фитогормонов выше необходимого физиологического уровня и при этом наблюдается их токсическое действие. Отрицательное действие цитокининов возможно преодолеть, используя питательные среды с минимальной концентрацией цитокининов, обеспечивающих стабильный коэффициент размножения, или чередованием циклов культивирования на средах с низким и высоким уровнем цитокининов.

III-IV этапы – укоренение микропобегов, их последующая адаптация к почвенным условиям и высадка в поле. Это наиболее трудоемкие этапы, от которых зависит успех клонального микроразмножения. На этапе укоренения и высадки в грунт обычно изменяют основной состав среды. Уменьшают количество солей и углеводов, исключают цитокинины и добавляют ауксины. Выбор концентрации ауксинов, необходимых для нормального укоренения побегов зависит от ряда причин. Среди них назовем наследственную предрасположенность побегов к укоренению, обусловленную видовыми и сортовыми особенностями родительских растений, тип используемого ауксина, а также концентрацию и соотношение фитогормонов на этапе размножения побегов. Эффективность ауксинов при укоренении побегов в значительной мере уменьшается под влиянием высоких доз цитокининов, вносимых в питательную среду на первом и втором этапах микроразмножения. Вероятно, целесообразно при культивировании на первых этапах использовать среды сначала с более высокими, а затем – низкими концентрациями цитокининов.

В некоторых случаях корнеобразование стимулируется добавлением хлорогеновой или феруловой кислот. Можно также рекомендовать обработку базальной части побегов, извлеченных из пробирок, растворами стимуляторов ауксинового типа в более высоких концентрациях в течение 3–6 ч, а затем укоренение их в безгормональной агаризованной среде или *ex vitro* в подходящем субстрате. Этот метод в ряде случаев предпочтительнее, чем постоянное присутствие ауксинов в среде.

Лучшим временем для высадки в грунт микроклонов является период, когда начинают разрастаться корни, а молодые листья становятся достаточно развитыми и способными к фотосинтезу, что обеспечивает растению полную автономность. Перед высадкой в грунт освещенность, как правило, повышают до 10000 лк. Высокая интенсивность освещения может задерживать рост растений и вызывать небольшие хлорозы, тем не менее, эти растения в почве чувствуют себя значительно лучше и растут более энергично, чем растения, не подвергнутые предварительной закалке к высокой интенсивности света.

Наиболее благоприятное время для пересадки пробирочных растений в грунт – весна или начало лета. Растения с двумя-тремя листьями и развитой корневой системой осторожно вынимают из колб или пробирок пинцетами. Корни отмывают от остатков агара и высаживают в почвенный субстрат, предварительно простерилизованный при 85-90 °С в течение 1-2 ч. Для большинства растений в качестве субстратов используют смеси в следующих соотношениях: торф : песок (3:1); торф : дерновая земля : перлит (1:1:1); торф : песок : перлит (1:1:1). Пикировочные ящики или торфяные горшочки, в которых выращивают растения-регенеранты, заполняют заранее приготовленным почвенным субстратом.

Известно, что относительная влажность воздуха при культивировании побегов в сосуде достигает 100%. Поэтому основной задачей акклиматизации *ex vitro* регенерированных растений является создание относительно высокой влажности воздуха в первые дни после пересадки, поскольку значительные потери воды могут привести к гибели микроклонов. Для лучшего роста растений создают условия искусственного тумана. В тех случаях, когда нет возможности создать такие условия, горшочки с растениями накрывают стеклянными банками или полиэтиленовыми пакетами. Без создания условий с повышенной влажностью наблюдается очень быстрое подвядание

листьев у регенерантов и последующая гибель растений. Возможно, что одной из причин, вызывающей гибель растений, является водный дефицит, создаваемый высокой транспирационной активностью листьев и низкой поглотительной способностью корней. Кроме того, излишние потери воды могут быть связаны с отсутствием кутикулярного воска на побегах, культивируемых *in vitro*. Для повышения выживаемости высаженных в грунт растений, проводят их закаливание: в течение 1-1,5 недель увеличивают продолжительность пребывания их на открытом воздухе.

Индийскими учеными предложен простой метод предотвращения быстрого обезвоживания листьев растений, выращенных *in vitro*, во время их пересадки в полевые условия: листья в течение всего акклиматизационного периода следует опрыскивать 50%-ным водным раствором глицерина или смесью парафина (жира) и диэтилового эфира (1:1). Применение этого метода помогает избежать длинных и затруднительных процессов закаливания пробирочных растений и обеспечивает 100% выживаемость.

Через 20 – 30 дней после посадки хорошо укоренившиеся растения подкармливают солями Кнудсона, Мурасиге и Скуга, Чеснокова, Кнопа (в зависимости от вида растений) или комплексным минеральным удобрением. По мере роста микроклонов их рассаживают в большие емкости со свежим субстратом. Дальнейшее выращивание акклиматизированных растений соответствует принятой агротехнике выращивания данного вида растений.

Факторы, влияющие на эффективность клонального микроразмножения

При выборе метода клонального микроразмножения растений необходимо учитывать влияние генетических, физиологических, гормональных и физических факторов. Это связано с тем, что разработанная технология получения определенных микроклонов для одного вида растения не всегда подходит для других методов микроразмножения и, тем более, не может быть применена для растений другого вида. На размножение *in vitro* влияют генотип, возраст исходного растения, сезонность изоляции, а также размер исходного экспланта. Из гормональных факторов – соотношение цитокининов и ауксинов, состав питательной среды, а из физических – кислотность

среды, условия освещения, а также температурный режим и относительная влажность воздуха.

Генетические и физиологические факторы. Наибольшее влияние на морфогенетический потенциал культивируемых тканей и органов оказывают генетические факторы. Так, двудольные травянистые растения обладают более выраженной способностью к регенерации, чем однодольные.

В литературе встречается много указаний на важность сортовых особенностей в процессе микроразмножения. У разных сортов черной смородины наблюдается достоверное различие корнеобразующей способности изолированных верхушек побегов. Регенерирующая способность фрезии также в большей степени зависела от сортовых различий, чем от соотношения и концентрации фитогормонов в среде.

У растений хмеля было показано, что изолированные апексы различных сортов по-разному реагируют на присутствие в питательной среде регуляторов роста. Апексы сорта Смолистый не реагировали на добавление в питательную среду ИУК и 2,4-Д, а у сорта Истринский-15 увеличивался рост побегов на среде с 0,05 мг/л ИУК и 0,05 мг/л 2,4-Д. Для изолированных апексов крыжовника также были отмечены сортовые различия в морфогенетических реакциях на условия культивирования. Так, апексы, культивируемые на питательной среде Мурасиге и Скуга с добавлением БАП 0,5 мг/л, у сорта Финик пролиферировали каллус, из которого затем формировались побеги, а апексы сортов Русский, Колобок, Розовый обладали способностью к прямой регенерации. Сортовая специфика может проявляться и при укоренении микропобегов. Например, для микропобегов вишни было отмечено, что у сорта Шубинка после обработки ИМК (50 мг/л) укоренялось 52% микропобегов, у сорта Владимирская – 18%, а у сорта Любская – 13%. Для разных сортов черной смородины также наблюдаюсь достоверное различие в корнеобразующей способности изолированных верхушек побегов.

Способность к морфогенезу различна у разных органов одного и того же растения, поэтому при разработке технологии клонального микроразмножения конкретной культуры необходимо всестороннее исследование морфогенетического потенциала растения, целью которого является выбор оптимального вида размножения. Например, при изучении морфогенеза фрезии в культуре тканей в качестве экспланта использовали следующие органы: апикальные и пазушные

почки вегетирующих, хранящихся и воздушных клубнелуковиц, сегменты клубнелуковиц, генеративные почки, цветки, пыльники, сегменты листа и корня. Были определены оптимальные способы микроразмножения. Первый – образование адвентивных побегов из цветочной почки с последующей индукцией пролиферации пазушных почек. При этом одновременно происходила индукция развития адвентивных побегов из основания побегов и развивающейся каллусной ткани. Второй – развитие всех существующих меристем клубнелуковиц. Третий – образование адвентивных побегов из тканей клубнелуковицы и развивающегося на ней каллуса.

К физиологическим факторам относится время (сезон года) изоляции экспланта. Ткани и органы, изолированные в момент вегетации растений, обладают более высокой чувствительностью к составу питательной среды и способны с высокой частотой образовывать адвентивные почки, формировать побеги и укореняться, по сравнению с тканями, взятыми в качестве экспланта, в период глубокого и вынужденного покоя. Например, весенняя посадка апексов крыжовника сорта Финик на питательную среду Мурасиге и Скуга, содержащую БАП 0,5 мг/л, способствовала пролиферации каллуса, из которого затем индуцировалось формирование побегов с высокой частотой. В то же время летняя изоляция апексов стимулировала более интенсивную пролиферацию каллуса, но при этом уменьшался процент регенерации побегов.

Размер экспланта также является фактором, определяющим успех микроразмножения. Чем меньше эксплант, тем меньшей регенерационной способностью он обладает, и наоборот. Экспланты большего размера, состоящие из паренхимы, проводящей ткани и камбия, могут в питательной среде спонтанно, независимо от содержания фитогормонов, образовывать побеги. С другой стороны, в клетках крупного экспланта увеличивается возможность появления вирусов и других патогенов, что препятствует оздоровлению размноженных в культуре тканей растений. Оптимальная величина экспланта зависит от видовых особенностей растения-донора и свойств органа, из которого изолирован эксплант. Установлено, что размер первичного экспланта малины должен иметь размер 2 мм, при таких условиях 60% апикальных меристем регенерируют на питательной среде. Для хмеля этот показатель колеблется от 0,1 до 0,2 мм, а для лука и чеснока – от 0,5 до 0,8 мм.



Рис.9. Стеллажи клонированных растений в фитотроне.

У многих растений морфогенетическая способность изолированных тканей, в частности, меристематических, зависит от расположения почек на побегах. Так, при исследовании регенерационной способности терминальных и латеральных почек побегов крыжовника сорта Русский было показано, что наибольшим морфогенетическим потенциалом обладают три верхние почки. У растений спаржи почки нижней части побега обладают большей регенерационной способностью, чем почки средней и апикальной частей.

Гормональные факторы. В большинстве случаев исследователи отдают предпочтение среде Мурасиге и Скуга. Отличительной особенностью этой среды является высокая концентрация неорганического азота. Азот является незаменимым элементом в питательной среде. Реализация морфогенетического потенциала растений во многом определяется формой азота и его концентрацией. Согласно данным Язавы пазушные почки побегов диоскореи при культивировании их на питательной среде, содержащей только ион NO_3^- или ионы нитрата и аммония в соотношении 4:1, формировали воздушные луковички. На питательной среде, содержащей $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ в соотношении 1:1 или 1:2, наблюдалось формирование побегов из пазушных почек. Сочетание аммонийного и нитратного азота в среде Мурасиге и Скуга оптимально как для процессов неорганизованного роста, так и для процессов органогенеза. В то же время в ряде случаев снижение концентрации азота в питательной среде улучшает морфогенез, как, например, у крыжовника сортов Инвикта и Карл, томатов. Для глоксинии была отмечена зависимость образования вегетативных и репродуктивных структур от компонентов питательной среды. Так, при высокой концентрации KNO_3 (20 мМ/л) и сахарозы (100 мМ/л) преимущественно развивались вегетативные почки, а цветочные только у 28% эксплантов. При низком содержании KNO_3 (2 мМ/л) и сахарозы (15 мМ/л) на всех эксплантах наблюдали образование только цветочных почек.

На всех этапах клонального микроразмножения в качестве источника углеродного питания используют 3% сахарозу. Однако эта концентрация не является оптимальной для всех вводимых в культуру *in vitro* растений. Экспериментально показано, что сахароза является фактором, способным направить развитие побегов каперсов либо в вегетирующие почки, либо в пурпурные почки возобновления. При культивировании апикальных и боковых почек на среде, содержащей сахарозу в концентрации 3% и более, наблюдается появление антоциановой окраски почек, что является признаком перехода почек в состояние зимнего покоя. При использовании пониженных концентраций сахарозы (менее 3%) происходит формирование зеленых почек, способных в дальнейшем к размножению.

В работах с изолированными зародышами ели обыкновенной было также выявлено отрицательное влияние высокой концентрации сахарозы (2-3%) на образование адвентивных почек. Показано, что уже

на втором пассаже этот процесс практически не происходит, а к четвертому пассажиру наблюдается гибель всех эксплантов. Понижение концентрации сахарозы в среде стимулировало не только образование адвентивных почек, но и дальнейшее развитие их в побеги. При 0,5-1%-ной концентрации сахарозы в среде побеги через 2-3 месяца культивирования имели высоту 1-1,5 см и затем использовались для дальнейшего размножения или укоренения.

Важнейший фактор, влияющий на эффективность клонального микроразмножения – гормональный баланс питательной среды. При высоком соотношении цитокинин : ауксин происходит развитие пазушных меристем или образование адвентивных почек, при низком – индуцируется корнеобразование, а при среднем – происходит пролиферация каллуса. Наиболее часто используют цитокинины: кинетин (6-фурфурилметиламинопурин), БАП (6-бензиламинопурин), зеатин.

Перечислим функции цитокининов, которые приводят к микроразмножению растений. Цитокинины снимают апикальное доминирование и индуцируют развитие пазушных почек, нарушают покой и стимулируют рост покоящихся органов. Цитокинины регулируют рост соматических зародышей и формирование растений. Они необходимы для дифференциации стеблевых почек в культуре каллусных тканей и при регенерации побегов из клеток экспланта. Таким образом, все морфогенетические реакции растений, используемые при микроразмножении, и их нормальная реализация нуждаются в экзогенных цитокининах. Кроме того, цитокинины замедляют старение органов и повышают их устойчивость к неблагоприятным факторам внешней среды.

При культивировании пазушных почек гречихи на средах с различными концентрациями цитокининов наилучший результат дает БАП в концентрации 0,5 – 1 мг/л, а также БАП (2,23 мг/л) + ИУК (0,175 мг/л).

Другой класс фитогормонов – ауксины и их синтетические аналоги НУК (α -нафтилуксусная кислота), 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота). Ауксины влияют на растяжение клеток, деление и дифференцировку. Наиболее выраженный органогенный эффект ауксинов – это стимуляция образования корней. Под их влиянием происходит деление клеток паренхимы побега. Вместе с тем ауксины тормозят рост сформировавшихся корней, поэтому для избыточных

концентраций ауксина характерно обильное заложение корневых зачатков, рост в длину которых значительно подавлен. При этом происходит разрастание корней в ширину. Развитие ненормально утолщенных укороченных корней может приводить к слабому росту растений *in vitro* и гибели полученных растений при пересадке в почву.

Изолированные побеги герберы, пересаженные на среду, содержащую 0,57 – 5,7 мкМ/л ИУК, формировали в пробирочной культуре нормальную корневую систему. После появления корней начинался интенсивный рост растеньиц. Повышение концентрации ИУК до 5,7 мкМ/л в среде приводило к развитию многочисленных ненормально утолщенных корней и к общему угнетению роста побегов. Более высокие концентрации ауксинов приводили к полной гибели растений.

Экзогенные ауксины стимулируют также образование луковичек в культуре тканей, принимают участие в регенерации побегов из каллуса и непосредственно из тканей экспланта.

Гиббереллины – класс соединений, включающий более 30 веществ. В микроразмножении в основном используют гиббереллин А₃ (гибберелловая кислота) или сокращенно ГК₃. Экзогенные гиббереллины усиливают рост и вытягивание стебля, листьев, индуцируют прорастание семян, снимают состояние покоя. Под влиянием гиббереллинов удлиняются цветоножки, увеличиваются размеры и количество цветков. ГК₃ вносят в питательную среду в основном с целью ускорить рост сформировавшихся почек и получить растения с хорошо развитой надземной частью.

Говоря о той важной роли, которую выполняют фитогормоны в микроразмножении, нельзя не отметить, что арсенал используемых фитогормонов весьма ограничен. Природные фитогормоны, отличающиеся значительным морфогенетическим эффектом, дороги, а эффективность уже имеющихся их синтетических аналогов еще далека от желаемой. Поэтому для многих хозяйственно полезных растений методы микроразмножения не могут быть реализованы из-за невозможности индуцировать морфогенетические реакции в культуре тканей известными фитогормонами. В связи с этим в настоящее время внимание физиологов, химиков, растениеводов, занимающихся культивированием растительных тканей, направлено на изучение новых гормональных препаратов, обладающих высокими морфогенетическими эффектами.

В лаборатории Р.Г. Бутенко изучалось влияние новых синтетических регуляторов роста ДРХ-4189, тиадиазурона, картолина, обладающих цитокининовой активностью, на микроразмножение герберы и фрезии. Было показано, что все три соединения в оптимальных концентрациях стимулируют морфогенетические реакции в культуре тканей герберы и фрезии. ДРХ-4189 и тиадиазурон оказывались более эффективными для активации пазушных меристем побегов герберы, а картолин – для нарушения покоя пазушных почек клубнелуковиц фрезии. При этом максимум стимулирующей активности у ДРХ-4189 и тиадиазурона приходился на более низкие концентрации, чем при использовании традиционных цитокининов БАП или кинетина. Таким образом, использование этих соединений для микроразмножения растений и, в частности, герберы и фрезии, может привести к значительному удешевлению культуральных сред.

Биологические вещества негормональной природы (витамины, аминокислоты, растительные экстракты, гидролизат казеина) не существенно влияют на процессы клонального микроразмножения.

Физические факторы. На клональное микроразмножение и рост растений влияет кислотность среды, определяющая доступность для растений питательных веществ. Известно, что сильно кислые или щелочные среды лимитируют поступление некоторых элементов, например, фосфора и железа, делая их относительно нерастворимыми, и ограничивают тем самым рост растений. В то же время при высокой кислотности другие элементы переходят в растворенное состояние и становятся токсичными для эксплантов.

Как правило, ткани и органы растений культивируют на питательной среде с рН 5,6-5,8. Однако эти условия не всегда являются оптимальными. Например, было показано, что для культуры зародышей сосны обыкновенной изменение кислотности среды до 5,2 позволяет увеличить в 2,5-3 раза образование адвентивных почек, а для культуры ели обыкновенной наиболее благоприятный рН находится в пределах 5,2-5,6. Таким образом, кислотность культуральной среды совпадает с кислотностью почв, на которых произрастают данные породы в естественных условиях. Поэтому биотехнологи должны учитывать в экспериментах по культуре тканей кислотность почв естественного произрастания исследуемых растений.

Изолированные ткани растений выращивают при освещении люминисцентными лампами с учетом требований материнского

растения к фотопериоду. Обычно при клональном микроразмножении растения культивируют при 1000-5000 лк и 14-16-часовом фотопериоде, такие условия освещения способствуют инициации образования побегов и корней у большинства растений. Тем не менее, многие исследования свидетельствуют о важной роли интенсивности освещения в индукции органогенеза. Так, увеличение освещенности с 3000 до 6000 лк способствует интенсивному побегообразованию в культуре бегонии. Максимальное образование побегов и корней в культуре тканей аспарагуса отмечается при 1000 лк, снижение или увеличение освещения угнетает органогенез тканей.

Интенсивность и характер роста изолированных тканей зависят и от спектрального состава света. Так, белый, красный и синий свет более интенсивно индуцируют образование почек у *Heloniopsis orientalis*, чем зеленый. Красный свет стимулирует образование цветочных почек у ткани табака, а темнота – образование корней. Адвентивные почки в каллусе табака индуцируются ультрафиолетовым, голубым и фиолетовым светом. У эксплантов салата красный свет вызывает образование побегов. Для пробирочных растений картофеля было установлено, что присутствие в среде НУК или ИУК значительно сильнее стимулируют клубнеобразование на красном, чем на синем свете, тогда как БАП или кинетин вызывают активное клубнеобразование на синем свете по сравнению с красным светом. Наиболее благоприятное действие на укоренение побегов березы, активацию существующих меристем оказывает красный свет, при котором практически 100% микрочеренков образуют корни. При белом свете этот процесс идет менее активно, а при синем – корни образуются только у половины черенков, а в темноте – у еще меньшего числа. Сочетание красного света с введением в среду ИУК значительно ускоряет процесс корнеобразования и повышает интенсивность роста побегов. Синий свет увеличивает содержание цитокининов в тканях растений и тем самым стимулирует образование побегов.

Температура оказывает значительное влияние на рост и регенерацию растений, способствуя активации метаболических процессов. Для большинства растительных тканей температурный оптимум составляет 23-25 °С. Однако существуют различия между растениями в отношении их требований к температуре. Так, образование луковичек у *Lilium auratum* наиболее эффективно при 20 °С. Охлаждение эксплантов, предшествующее культивированию

тканей гладиолуса, улучшает их регенерационную способность. Низкие температуры (15-18 °С) в течение 2-х недель необходимы для индукции образования побегов в культуре черешков бегонии. Для почек цветоносов фаленопсиса отмечается влияние температуры на тип морфогенеза: при 28 °С из почек регенерируют вегетативные побеги, а при 20 °С – генеративные.

Температурный режим зависит, главным образом, от вида растений. Так, например, для тропических растений оптимальная температура выращивания приближается к 27 °С, для растений альпийских лугов – 18-20 °С, для большинства других – 25 °С.

Проблемы и перспективы клонального микроразмножения

Эффективность методов *in vitro* в ускорении вегетативного размножения в сочетании с преимуществами, которые дают эти методы при защите растений от болезней, делают их заманчивой практической альтернативой традиционным технологиям, используемым при размножении многих растений. Как только основная часть освобожденного от инфекции материала переведена в культуру, она не подвергается заболеваниям до высадки в грунт. Применение технологий микроразмножения позволяют снизить себестоимость получаемого в больших количествах оздоровленного посадочного материала. Для некоторых культур метод *in vitro* – единственный путь для получения посадочного материала.

Вместе с тем лаборатория по размножению растений методом культуры тканей требует больших капиталовложений и соответственно больших текущих расходов по сравнению с традиционным производством. Большая часть финансовых затрат приходится на фонд заработной платы. Более того, персонал должен владеть стандартными методами микробиологии и иметь достаточные знания как в области биологии растений, с которыми ведется работа, так и их поведения *in vitro*. Это необходимо для правильного ухода за культивируемыми растениями и достижения хороших результатов. Правильная организация труда позволяет все трудоемкие операции свести к минимуму, но, не смотря на это, конечный продукт при всех его преимуществах оказывается дорогостоящим.

Создается впечатление, что любое растение при благоприятных условиях и наличии соответствующих реактивов можно культивировать *in vitro*, но в настоящее время эффективно размножают этим методом

лишь незначительное число видов растений. До сих пор у многих хозяйственно ценных видов трудно или невозможно вызвать регенерацию или образование корней. При культивировании растений применяют системный подход с учетом структуры, жизненного цикла и биохимии растения, хотя методы остаются, главным образом, эмпирическими. Для основных культур время и затраты на размножение *in vitro* могут окупаться, однако для большинства декоративных и других растений такая технология размножения просто не может быть рентабельной до тех пор, пока не будет упрощена.

Технические трудности клонального микроразмножения. В процессе культивирования многие растения продуцируют избыточные количества фенольных веществ, продукты окисления которых не только вызывают потемнение ткани и культуральной среды, но и подавляют рост. Если это связано с реакцией исходного экспланта, то ее можно предотвратить обработкой аскорбиновой или лимонной кислотой.

Рост и регенерацию микроклонов улучшают добавлением в культуральную среду активированного угля, способствующего удалению ингибирующих веществ. К сожалению, активированный уголь связывает также гормоны и другие вещества, что сужает область его применения *in vitro*.

Иногда при культивировании растений развиваются разбухшие, искривленные листья, которые необратимо становятся прозрачными и некротическими, что может вызывать гибель побегов. Такое явление, названное «впитыванием воды» и описанное как «витрификация», возникает в проростках, выращенных на среде, содержащей цитокинины. Витрификацию можно предотвратить уменьшением концентрации гормонов. Поэтому для клонирования линий гречихи, склонных к витрификации, используют чередование среды с цитокининами и безгормональной среды (через 3 – 5 пассажей). По мнению некоторых исследователей, основной причиной витрификации является высокий водный потенциал среды. Для его снижения часто увеличивают концентрацию агара в среде, а связанное с этим уменьшение коэффициента размножения компенсируют внесением в среду одновременно трех цитокининов – кинетина, БАП и зеатина.

По гипотезе Кеверса, витрификация – это ответ на стресс, который вызывают ионы аммония, цитокинины и этилен, присутствующие в избытке в культуральной среде. Витрификацию, согласно этому автору, можно преодолеть улучшением газообмена в сосудах и применением

циркулирующих жидких сред, в которых контролируется концентрация ионов аммония и цитокининов.

Биологические исследования показывают, что в витрифицированных листьях снижается активность ФАЛ (фенилаланинаммиаклиазы) и кислых пероксидаз, увеличивается активность основных пероксидаз, что приводит к уменьшению лигнификации. Разнообразие гипотез, связанное с разнообразием объектов, показывает, что пока мало ясности в понимании причин витрификации, а отсюда и способы борьбы с ней носят эмпирический характер.

Постоянно встречающаяся трудность в лабораториях, использующих методы *in vitro*, состоит в заражении культур медленно растущими и часто визуально невидимыми бактериями. Они могут не оказывать явного воздействия на развивающиеся побеги, однако жизнеспособность растений и последующее формирование корней часто подавлены. Большая часть микроорганизмов – сапрофиты, сохранившиеся после стерилизации исходного материала. Такое заражение может быть уменьшено использованием только чистого исходного материала, растущего без избытка влаги. Более серьезную проблему представляют бактерии, живущие внутри тканей растения, поскольку их трудно удалить обычными методами стерилизации. Загрязнение промышленно культивируемых тканей некоторых декоративных растений вызывает *Ervinia carotova* – патоген многих садовых растений. Присутствие этих бактерий в культуре тканей приводит к снижению жизнеспособности и хлорозу растений-регенерантов, которые при традиционном промышленном производстве нечувствительны к этим возбудителям. Дополнительные меры предосторожности включают изоляцию эксплантов из частей растения, свободных от возбудителей (апикальная меристема). В процессе культивирования для оздоровления растения-донора используют высокую и низкую температуру, антибиотики. И даже в этом случае важно использовать надежные методы тестирования для выявления возможного заражения.

Качество растений, размножаемых *in vitro*

Зачастую растения, размножаемые методами культуры тканей, не всегда аналогичны исходным материнским формам. Это может быть вызвано рядом причин, которые относятся двум категориям:

1) кратковременные изменения в развитии, так называемые эпигенетические эффекты;

2) генетические изменения, возникающие в результате генных или хромосомных мутаций.

Эпигенетические изменения обусловлены влиянием условий культивирования на растения, и регенеранты, полученные *in vitro*, могут их преодолеть после высадки в грунт. Для таких растений характерно небольшое число первых листьев, имеющих неправильную форму и рано увядающих. Это важно, если растения выращиваются непосредственно для продажи, как например, папортники или листовенные растения. Тщательный подбор среды и времени пересадки в компост позволяет избежать этих негативных проявлений.

Повреждение апикальной части может вызывать более долговременные морфологические отклонения, представляющие собой, например, повышенное ветвление или изменение расположения листьев. Так, при микроклональном размножении земляники в течение 2-х лет после высадки в грунт наблюдали увеличение числа розеток и нарушения во взаимном расположении листьев, в результате чего растения выглядели низкорослыми и сильно ветвистыми. На удаленном апексе обнаружили множество точек роста, расположенных линейно или случайно по окружности. Явление усиливалось при повышении концентрации БАП, но подавлялось ГК₃. Авторы пришли к заключению, что этих нарушений можно избежать, используя соответствующие концентрации гормонов, и сохранить при этом достаточно высокие скорости размножения.

Генетические изменения. Спонтанные мутации неизбежно происходят в процессе получения всех культуральных растений. При обычном размножении легко выявить растение, в котором произошла мутация. Изменения таких признаков, как форма листьев, окраска цветка или качество плода у микроклонов могут быть выявлены лишь после того, как растение высажено в грунт и выращено. Поэтому возникающие *in vitro* спонтанные мутации часто остаются незамеченными. Чем раньше в процессе нарастания культуральной массы произойдет мутация, тем выше будет содержание мутантных побегов.

Риск получения больших количеств мутантных растений при микроклональном размножении снижают увеличением количества исходного материала, т.е. на начальной стадии необходимо

использовать как можно больше верхушек побегов или эксплантов. При этом лучше также избегать повторного использования в качестве эксплантов побегов, полученных *in vitro* (они могут содержать мутантный материал).

Опыт экспериментальной работы показывает, что генетически стабильны организованные меристемы, и пазушные почки обладают значительной генетической устойчивостью. Как известно пазушные меристематические ткани возникают на боковых поверхностях стеблевого апекса и включают в себя несколько дискретных слоев ткани туники и корпуса. Мутация представляет собой событие, произошедшее в одной клетке. Клетка, содержащая спонтанную или индуцированную мутацию, может делиться, образуя лишь ограниченный участок ткани внутри одного слоя, что приводит к образованию химеры, которая обычно оказывается нестабильной и быстро погибает. Таким образом, растения, регенерированные из пазушных меристем, оказываются генетически стабильными.

Адвентивные побеги возникают из различных меристем (кроме апикальных и пазушных), а также путем редифференциации соматических клеток. В отличие от пазушной добавочная меристематическая ткань предрасположена к мутагенезу, поскольку обычно возникает из одиночной клетки или из небольшой группы клеток. Селекционер, таким образом, может получить полностью мутантные побеги (а не химеры) гораздо легче, обрабатывая мутагеном регенерируемую ткань какого-нибудь органа, или даже рассчитывая на спонтанную мутацию. Поэтому необходимо с осторожностью относиться к любой системе *in vitro*, содержащей добавочные меристематические ткани и используемой для размножения растений.

Мутации в тотипотентных клетках могут быть увеличены в результате возможного мутагенного действия веществ питательной среды, таких как НУК, БАП, 2,4-Д, однако убедительных данных о прямом мутагенном действии этих веществ не получено. Изменчивость среди растений, регенерированных *in vitro* из соматических клеток, бывает весьма заметна. Внутренние механизмы возникновения ее пока не выяснены, но очевидно, что генетические изменения в тканях происходят часто, но проявляются лишь после регенерации. При традиционном черенковании естественная регенерация происходит из ткани, которая обычно не является полисоматической (полиплоидной),

например, из эпидермиса или из определенных участков флоэмной паренхимы.

В каллусе, даже если он был специально получен из строго неполисоматического (не полиплоидного) экспланта, обычно начинает развиваться все возрастающее количество полиплоидных и анеуплоидных клеток, особенно при использовании 2,4-Д или НУК. Полиплоидия возникает у 90% видов растений. Появляются как хромосомные мутации, так и мутации определенных генов. В каллусных культурах могут появляться значительные соматональные вариации, в результате чего регенерированные растения значительно отличаются по морфологии, скорости роста, чувствительности к гормонам. Несмотря на многочисленные сообщения о регенерации из каллусов диплоидных растений, зафиксировано много случаев появления полиплоидных и анеуплоидных регенерантов. Описаны случаи мутации генов: у растений из каллусных культур хризантемы изменены окраска цветов, выделены полезные мутанты у сахарного тростника и др.

Таким образом, в настоящее время для обеспечения генетически однородных проростков предпочтительным методом размножения *in vitro* является размножение пазушными побегами. Лаборатории, занимающиеся микроразмножением, по возможности используют именно этот метод, и поэтому без особых трудностей получают генетически однородный посадочный материал.

Для некоторых видов удалось получить микроклоны методом активации пазушных побегов и регенерировать растения из каллуса. Растения аспарагуса, размноженные с помощью первого метода, не имели генетических нарушений, тогда как растения, регенерированные из каллуса, содержали до 70% полиплоидов. Среди примерно 1500 гвоздик, размноженных пазушными побегами, мутантов не было, а при использовании каллуса образовывались растения с измененной окраской цветка.

Размножение придаточными (адвентивными) побегами применимо к растениям, у которых пазушные побеги образуются редко. Для этого метода необходим тщательный выбор экспланта и концентраций гормонов в среде. У некоторых видов легко образуются аномальные растения, например, у кормовой капусты среди растений, регенерированных непосредственно из эксплантов листа и стебля, встречалось более 70% тетраплоидов и 15% октаплоидов. Тем не менее,

не все добавочные побеги образуются из одного слоя ткани или отдельной клетки. У многих луковичных растений добавочные меристемы формируются у основания чешуек или листьев, по крайней мере, из 2-х слоев клеток, что увеличивает вероятность получения нормальных регенерантов.

Размножение древесных растений *in vitro*

Широкий круг древесных пород, произрастающих от тропиков до северных широт, имеет очень важное экономическое значение. Обычно процесс улучшения признаков этих культур происходит очень медленно. Это обусловлено длительностью жизненного цикла деревьев: оборот сосновых лесов составляет 20-25 лет, промышленный оборот яблонь и других фруктовых деревьев – 20 лет и более, а плантаций масличной пальмы – еще больше.

Взрослые деревья, отобранные по определенным признакам, размножают вегетативным путем. Часто это трудоемкий процесс, требующий много времени, а в некоторых случаях, например, для однодольных пальм, обычное вегетативное размножение вообще невозможно.

Первые работы по культуре тканей древесных растений были опубликованы в середине 20-х годов XX века и связаны с именем французского ученого Готре. В них сообщалось о способности камбиальных тканей некоторых видов вяза и сосны к каллусогенезу *in vitro*. В последующих работах 40-х годов было выяснено о способности различных тканей вяза листового к образованию адвентивных почек. Однако дальнейший рост и формирование побегов авторами не были получены. Лишь к середине 60-х годов Матесу удалось получить первые растения-регенеранты осины, которые были доведены до почвенной культуры. Культивирование тканей хвойных пород *in vitro* долгое время являлось объектом исследования. Это было связано со специфическими трудностями культивирования ювенильных и тем более взрослых тканей, изолированных с растения. Известно, что древесные, и особенно хвойные, характеризуются медленным ростом, трудно укореняются, содержат большое количество вторичных соединений, которые в изолированных тканях окисляются различными фенолазами. В свою очередь, продукты окисления фенолов обычно ингибируют деление и рост клеток, что ведет к гибели первичного экспланта или к уменьшению способности тканей древесных пород к

регенерации адвентивных почек. Способность растения-донора к формированию адвентивных почек с возрастом постепенно исчезает полностью. Однако, не смотря на все трудности, ученые все чаще используют в качестве объектов исследований различные ткани и органы древесных растений. В настоящее время насчитывается более 200 видов древесных растений из 40 семейств, которые размножены *in vitro* (каштан, береза, клен, осина, сосна, ель, секвойя и др.), работы в этом направлении в нашей стране ведутся в научных учреждениях Москвы, Санкт-Петербурга, Воронежа, Уфы, Новосибирска, Архангельска и др.

Методы размножения деревьев *in vitro* включают в себя культуру побегов с размножением пазушных или придаточных побегов, а также каллусную культуру с регенерацией побегов или эмбриоидов.

Особое значение для вегетативного размножения древесных пород, как традиционными методами, так и в условиях *in vitro*, имеют ювенильные формы. Фаза роста растений после образования проростков называется ювенильной. Это фаза активного роста, часто характеризующаяся определенными морфологическими особенностями, такими как особая форма листьев, наличие шипов и неспособность к образованию цветков. В этой фазе вегетативное размножение обычно легко осуществимо. Ювенильное состояние продолжается несколько лет. В конце концов, дерево приобретает способность образовывать цветки, плоды и семена и вступает во взрослую фазу, характеризующуюся пониженной способностью к вегетативному размножению. Однако переход из ювенильной фазы, по-видимому, обратим, и некоторые ткани взрослого дерева обладают определенными физиологическими свойствами, характерными для проростков, например, высокой способностью к образованию придаточных корней. Такие ткани описываются как реювенилизованные.

Для экспланта, полученного из взрослых деревьев, важное значение имеет физиологическое состояние исходной ткани. В Научно-исследовательском институте Ассоциации лес-целлюлоза во Франции показали, что экспланты взрослых лесных деревьев *in vitro* растут медленно или вообще не растут, если взяты из неомоложенных тканей. Реювенилизованные ткани могут возникать естественным путем, например, мощные побеги, обычно называемые «волчками», вырастающие прямо из корней или скопления придаточных почек. Реювенилизацию можно вызвать различными воздействиями:

прививкой побегов на проростки, обрезкой побегов, поддержанием высоких концентраций удобрений, вегетативным размножением или опрыскиванием цитокининами.

В настоящее время реювенилизацию (омоложение) проводят несколькими способами:

- 1) многократная обработка растущего дерева или отдельных ветвей раствором цитокинина перед изоляцией экспланта;
- 2) повторное черенкование;
- 3) частая подрезка деревьев для индукции роста побегов непосредственно из ствола дерева или для стимуляции образования корневых отпрысков;
- 4) проведение повторных прививок;
- 5) путем серии субкультивирований *in vitro*;
- 6) создание густых насаждений, обеспечивающих боковое затенение, которое может стимулировать развитие спящих почек.

Для омоложения тканей в сочетании с цитокининами можно использовать и другие регуляторы роста. Например, у некоторых видов отмечается повышенная реакция, когда с БАП применяют N-диметиламиноянтарную кислоту в небольшой концентрации. Обрабатывают *in vivo* все растущее дерево или его отдельные ветви. Срезанные ветви погружают в раствор цитокинина или цитокинин вводят непосредственно в сосудистую систему дерева, например, через конец срезанной ветки путем инъекции. Обработку проводят с интервалом 4-5 дней, так как более частые воздействия гормонами могут вызвать отравление растений. Регуляторы роста индуцируют образование почек или побегов, которые приобретают морфологию, сходную с морфологией молодых особей. Затем побеги или короткие отрезки стебля, содержащие почки, помещают на питательную среду *in vitro* для индукции роста почек и побегов. Впоследствии сформировавшиеся побеги переносят либо на среду для размножения, либо на среду для укоренения. На промежуточной стадии их помещают на среду, способствующую раскрытию вновь образовавшихся почек и развитию их в побеги.

При культивировании экономически ценных деревьев, таких как фруктовые, также необходимо изолировать экспланты из реювенилизированных тканей. Так, для яблонь – наиболее часто культивируемых растений – размножение *in vitro* достигается легче, если начальные экспланты взяты из побегов молодых саженцев через

месяц после распускания почек. При этом используют методы хранения растений на холоде, поддерживая круглогодичный запас материала на этой стадии развития.

Культура пазушных побегов обычно инициируется из экспланта верхушки побега или пазушной почки. Культура придаточных побегов также инициируется из таких эксплантов, а также из фрагментов междоузлий, листьев, семядолей, подсемядольных колен и зародышей.

Экспланты из семян или проростков (ювенильный материал) обычно наиболее пригодны для культивирования *in vitro*. Для взрослых деревьев быстрого размножения достигают при условии, если эксплант взят из воздушных побегов (подвои яблони, сливы, вишни). Использование эксплантов из реювенилизированных естественным образом тканей перспективно для некоторых покрытосеменных лесных деревьев, а также для голосеменных.

Укоренение *in vitro* побегов голосеменных, полученных из эксплантов проростков и семян, обычно происходит гораздо сложнее, чем у покрытосеменных, о чем свидетельствует лишь незначительное число успешных попыток. Еще одной проблемой для голосеменных является то, что часть укоренившихся побегов плагиотропна (растут под определенным углом к направлению действия силы тяжести и света) и поэтому не годится для лесных посадок. Из-за сложности введения в культуру, укоренения и плагиотропности внешнего вида число видов голосеменных растений, которые можно было бы размножать в массовых количествах, в настоящее время ограничено. Реювенилизация тканей взрослых растений в процессе культивирования увеличивается. Больше всего сведений о реювенилизации *in vitro* получено для яблони. Так, для сорта яблони Нортен скорость размножения побегов в первые 4 месяца последовательных пересадок возросла в 4 раза.

Более того, способность побегов образовывать корни также увеличивалась после нескольких пересадок.

Присутствие в питательной среде флороглюцина вызывало 2-3-х кратное увеличение роста и укоренение побегов. Флороглюцин – продукт распада флоризина, основного фенольного соединения яблони, действие которого, очевидно, осуществляется через метаболизм ауксинов. Исследования показали, что такое действие фенольных соединений сохранялось лишь первые 3 месяца культивирования, когда способность к росту и образованию корней была низкой.

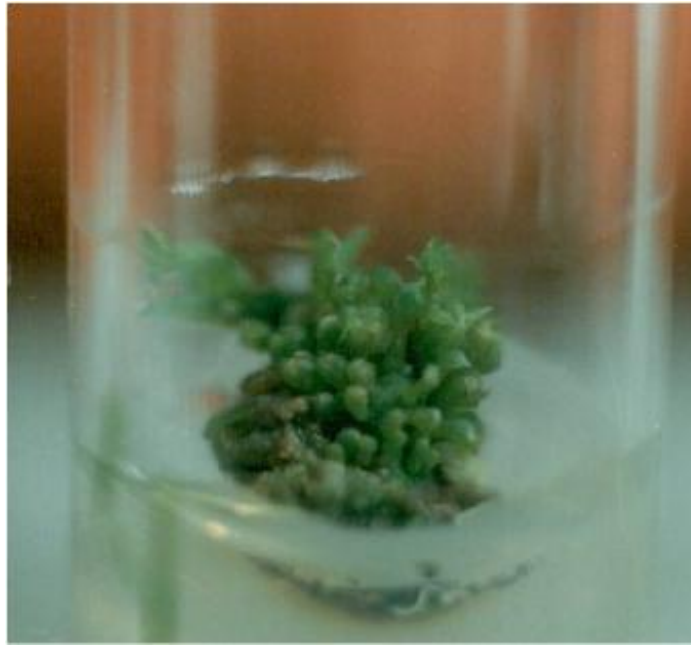
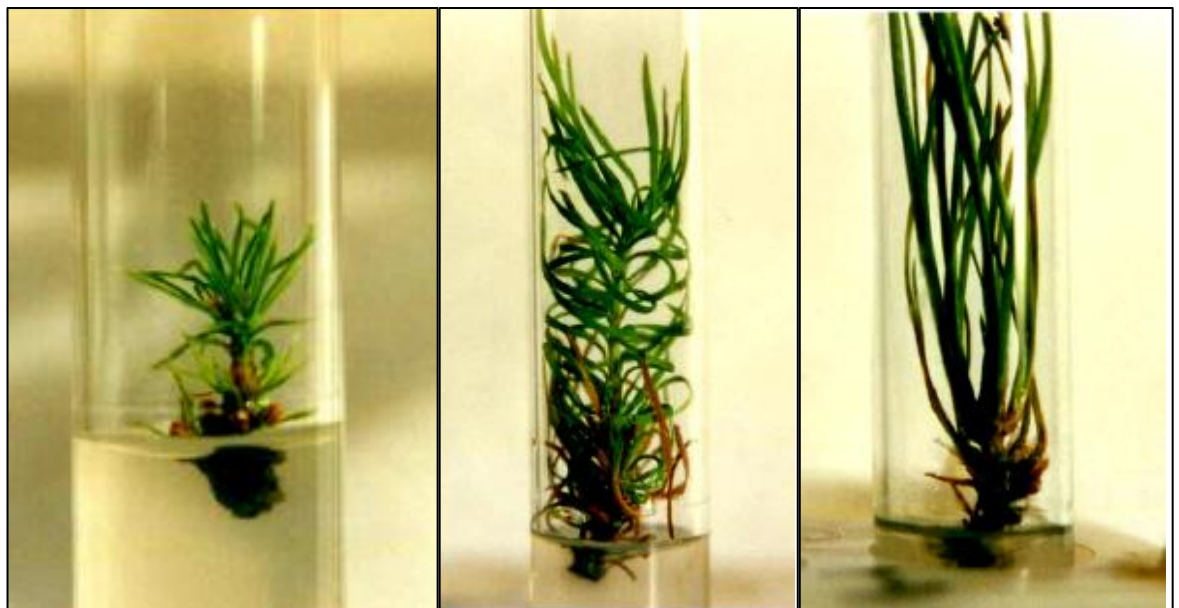


Рис. 10. Эксплант ели сибирской с адвентивными почками.



А

Б

В

Рис. 11. Развитие побегов из адвентивных почек, полученных на зародышах хвойных под действием цитокинина: 1 – ель сибирская (80 сут), 2 – лиственница сибирская (180 сут), 3 – сосна обыкновенная (180 сут).

Имеются и другие данные о действии флороглюцина на побеги яблонь. Для подвоя яблонь A_2 фенольные соединения улучшали образование и рост корней, а также существенно повышали выживаемость растений при пересадке в почву, причем в большей степени у культуры побегов, полученных из взрослых растений, чем из

проростков. Культуры проростков, по-видимому, не нуждаются в фенольных соединениях. Очевидно, что влияние флороглюцина зависит от сорта и физиологического состояния тканей. Таким образом, действие флороглюцина можно рассматривать как фактор, ускоряющий процесс реювенилизации *in vitro*.

При размножении деревьев через каллусную культуру используются те же подходы, что и при размножении травянистых растений. Крайне важно физиологическое состояние исходных эксплантов. Каллусы, полученные из семян и проростков, обладают наибольшей способностью к дифференцировке. Корни, побеги, эмбриоиды и регенеранты образуются как раз из такого каллуса, хотя для довольно ограниченного числа голосеменных и покрытосеменных. Однако эти системы каллусов не так эффективны для быстрого размножения деревьев (особенно если каллусы получены из взрослых деревьев через реювенилизированную ткань), как соответствующие системы культуры побегов. Исключение составляют несколько видов кофейного дерева, которые размножаются с высокой частотой через эмбриоиды, образуемые в каллусах из листовых эксплантов. Нуцеллярную ткань можно рассматривать как сильно омоложенную ткань взрослого дерева, и у цитрусовых образование эмбриоидов в каллусе, полученном из такой ткани, приводит к созданию настоящих клонов.

Успехи, достигнутые в середине 70-х годов XX века в области вегетативного размножения масличной пальмы методом культуры тканей *in vitro* заслуживают особого внимания с точки зрения экономического значения. Мировое производство масла гвинейской масличной пальмы (которое экстрагируется из мякоти плодов и идет на приготовление пищевого масла и маргарина) и масла капустной пальмы (экстрагируемого из косточек плодов и используемого для производства мыла, детергентов и косметики) в 1980-1981 гг. достигло 4,9 млн. т, а в 2005 мировое производство пальмового масла составило около 47 млн.т. Масличная пальма вышла на второе место среди масличных культур, уступая только сое.

Культура гвинейской масличной пальмы получила широкое распространение в 1960-1980 гг. В 1980 г. плантации данного вида занимали несколько миллионов гектаров во влажных тропиках Африки, Америки и Юго-Восточной Азии. Масличная пальма, живущая сто и более лет, становится малопродуктивной, как только дерево достигает

высоты, при которой плоды нельзя достать с земли орудием, снабженным ручкой. В культуре масличные пальмы начинают плодоносить на пятый год жизни, в целом эксплуатационный период длится 20-25 лет после прорастания. Таким образом, плантации должны обновляться каждые 25-28 лет, что требует миллионов проростков.

С другой стороны, масличная пальма, имеющая на одном растении мужские и женские цветы, принадлежит к перекрестноопыляемым растениям, что обеспечивает высокую степень изменчивости при образовании потомства. Скрещивание позволило отобрать формы с большим выходом масла. Были получены растения, которые давали 4 т масла с 1 га в год по сравнению с 1 т с га в год у обычных растений. Поскольку усовершенствование растений методом скрещивания сопряжено с большими затратами времени и требуют не менее 10 лет, усилия исследователей были направлены на вегетативное клонирование высокопродуктивных растений. Однако масличная пальма не образует побегов и боковых ростков в природных условиях, так что использование небольших ростков из ее стебля с целью размножения исключено. Ученым пришлось обратиться к культуре ткани *in vitro*. В опытах с масличной пальмой размножение микрочеренкованием оказалось невозможным, в результате от культивирования меристемы пришлось отказаться. Английские и французские исследователи решили получить каллусы из самых молодых листьев с верхушки дерева без повреждения меристемы верхушечной почки.

В первой культуральной среде каллусы развивались в течение 90 дней. При 2-ой и 3-ей пересадке начинали возникать эмбриониды. В течение месяца число эмбрионидов увеличивалось в 3 раза так, что примерно из 10 эмбрионидов за год можно было получить потомство более 500 000 растений. Авторы сообщали, что эмбрионидогенез больше зависел от природы начального экспланта, чем от последующих условий культивирования. Пятая культуральная среда давала возможность эмбриоидам развиваться в проростки с листочками, 6-ая и 7-ая индуцировали рост корней. Развитие растений от стадии эмбриоида до стадии проростков высотой 12 см происходило за 3 месяца.

На опытной станции (республика Кот-д'Ивуар) метод клонирования для получения проростков стали применять в промышленном масштабе с 1981 г. Более высокая стоимость клонированного материала обуславливает дополнительные капиталовложения, составляющие 7-12% от общей стоимости

плантации, использующей семенную рассадку. Однако при таком способе размножения происходит увеличение производства масла на 20-30% в год, что позволяет значительно быстрее окупить вложенные средства.

Проростки и взрослые финиковые пальмы также были размножены с помощью эмбриоидов, полученных из каллусов. Используемые методы были аналогичными тем, что применяли при размножении гвинейской масличной пальмы.

Информация о генетических отклонениях у деревьев, размноженных *in vitro*, ограничена, поскольку большинство таких деревьев остается на лабораторной стадии развития. Что касается организованных меристем побегов, они, по-видимому, генетически стабильны. Так, каллус из нуцеллуса цитрусовых состоял почти целиком из маленьких меристематических клеток, а растения-регенеранты были генетически однотипны. Более того, этот каллус адаптировался и не требовал присутствия высоких концентраций регуляторов роста в питательной среде, что также могло внести вклад в генетическую стабильность. Каллусы гвинейской пальмы тоже, по-видимому, были генетически стабильны, так как растения, регенерированные из эмбриоидов, были одинаковыми. Такая низкая изменчивость деревьев, размножаемых *in vitro*, показывает, что генетические отклонения не являются основной проблемой, по крайней мере, для некоторых видов.

Клональное микроразмножение деревьев рассматривают как рентабельное лишь для быстрого размножения новых сортов и в тех случаях, когда количество исходного материнского материала ограничено. Однако в связи с успехами в этой области владельцев питомников все более интересуется возможная финансовая выгода от использования методов *in vitro* для размножения деревьев.

Традиционный метод размножения фруктовых деревьев – прививка сортового привоя на подвой. В настоящее время в промышленных лабораториях Европы, Канады и США производятся подвои фруктовых деревьев с использованием культуры пазушных побегов. Такие деревья обладают высококачественными признаками. Наибольший опыт получения методами *in vitro* подвоев накоплен в Италии, причем большая часть из них – подвои персиковых деревьев, получаемые в производственных объемах. Перенос регенерантов в почву составляет 40-80% стоимости всего производства, однако предприятия получают

достаточный доход и осуществляют финансирование серьезных исследований по повышению эффективности пересадки микроклонов в почву, а также размножения привитых сортов плодовых деревьев. Кроме промышленного размножения плодовых культур *in vitro*, этот метод также применяется в программах по селекции при быстром размножении новых перспективных линий для полевых испытаний.

Прививка сортового привоя на подвой является длительным (не менее 3 лет) и дорогостоящим процессом, требующим высокой квалификации от работников питомников. В связи с этим размножение самоукореняющимися деревьями представляет собой более быстрый способ, имеющий значительное экономическое преимущество, особенно для современных садов с чрезвычайно густыми посадками фруктовых деревьев. Однако у большей части привойных сортов укоренение черенков трудный процесс, и лишь сравнительно недавно некоторые из них удалось размножить одревесневшими черенками в строго контролируемых условиях. В обычных условиях некоторые сорта яблонь образуют одиночные главные побеги и небольшое количество боковых побегов, тогда как *in vitro* они образуют пазушные побеги так же быстро, как и более мощные сорта.

В настоящее время многие привойные сорта яблонь быстро размножаются *in vitro* в различных лабораториях всего мира. Развитие таких растений идет с той же скоростью, что и обычных деревьев. Таким образом, омоложение в процессе клонального микроразмножения фруктовых деревьев не приводит к запаздыванию цветения, как можно было ожидать, если бы растения обладали всеми свойствами проростков. Полученные самоукореняющиеся деревья, могут быть использованы, как и традиционно размножаемые деревья, для прививки на подвой.

Традиционно лесные деревья размножают семенами. Размножение *in vitro* необходимо главным образом для повышения продуктивности деревьев, завязывающих мало семян. Наиболее важной областью применения считают массовое производство элитных взрослых растений, что приводит к значительному повышению продуктивности лесов. Например, во Франции в питомниках и лесах методом *in vitro* уже получено более 20000 видов деревьев из отобранных взрослых голосеменных, и рассматривается вопрос об использовании таких деревьев для закладки питомников омоложенных деревьев высокого качества с последующим лесонасаждением.



1



2



3

Рис.12. Размножение осины *in vitro*: 1 - микрочеренкование осины *in vitro*; 2 – укоренение микрорастений; 3 - адаптация микрорастений осины.

Многие экономически важные деревья инфицированы вирусами и, кроме того, они подвержены системному заражению бактериями и грибами. Оздоровленные деревья могут быть получены в ограниченных количествах культурой верхушечных меристем и тепловой обработкой. Размножение *in vitro* – идеальный метод для быстрого увеличения количества такого материала. В настоящее время в Англии начато промышленное размножение *in vitro* безвирусных подвоев.

Растения, регенерированные из нуцеллярного каллуса, обычно свободны от вирусов, так как патогены редко передаются через семена. Этим методом были удалены вирусы у цитрусовых.

В последние годы в данной области достигнут значительный прогресс, и уже сейчас размножение *in vitro* взрослых деревьев приносит важную практическую выгоду; в будущем вегетативное размножение *in vitro* станет неоценимым вспомогательным средством в разведении деревьев.

Таким образом, методы культуры побегов находятся вне конкуренции для размножения самого широкого круга древесных деревьев. Тем не менее, остаются широкие возможности улучшения этих методов в плане промышленного производства, а также применительно к объектам, которые пока не удастся культивировать. Некоторые растения, по-видимому, можно заставить размножаться *in vitro*, либо применяя методы, вызывающие омоложение, либо модифицируя существующие методы культивирования, например, изменяя неорганические и гормональные компоненты культуральной среды. Однако методы культивирования побегов довольно грубые и трудоемкие и требуют постоянного отделения побегов, укоренения и введения в почву. Эмбриогенез из каллуса или суспензии клеток, по-видимому, более перспективен для быстрого вегетативного размножения, а опыт работы с цитрусовыми и гвинейской масличной пальмой показывает, что полученный посадочный материал обладает генетической стабильностью.

Использование размножения *in vitro* при выведении новых разновидностей деревьев может оказаться очень важным, так как традиционное размножение обычной половой гибридизацией чрезвычайно трудоемко и длится многие годы. Более того, существует много экономически ценных пород, являющихся стерильными, для них улучшение признаков невозможно получить обычными методами селекции. В ближайшем будущем, вероятно, некоторые из этих ограничивающих факторов будут преодолены получением трансгенов, мутантов и полиплоидов из каллуса или одиночных клеток, генетически нестабильных или же предварительно подвергнутых мутагенному действию. В перспективе возможно использование методов культивирования пыльцы и протопластов, что также позволит расширить возможности селекции деревьев.

Таким образом, клональное микроразмножение является новым перспективным способом вегетативного размножения растений, позволяющим получать генетически однородный, оздоровленный посадочный материал, иметь высокий коэффициент размножения, сокращать сроки селекционного процесса, проводить работы в течение круглого года, экономя при этом площади, необходимые для выращивания растений. Во многих странах мира биоиндустрия клонального микроразмножения поставлена на поточную промышленную основу и представлена десятками активно функционирующих предприятий. Например, во Франции 94% всей продукции цветочных культур получают методом культуры изолированных тканей. В США около 100 коммерческих предприятий получают посадочный материал декоративных, овощных, плодовых и лесных культур методом клонального микроразмножения. Ведущим производителем оздоровленного посадочного материала цветочных культур является Голландия, а подвоев яблони, сливы и персика – Италия. В нашей стране также ведутся интенсивные работы по клональному микроразмножению растений, и в настоящее время многие научно-исследовательские институты и промышленные лаборатории разрабатывают и совершенствуют методы размножения *in vitro* и оздоровления различных декоративных, плодовых, ягодных, овощных, кормовых и древесных культур. Например, методы ускоренного размножения винограда, разработанные в Институте виноделия и виноградарства «Магарач», позволяют получать от одного черенка 8000 растений в течение 4 месяцев. Оздоровление посадок малины от комплекса вирусных заболеваний путем сочетания термотерапии и культуры апикальных меристем повышает продуктивность промышленной культуры в 6-8 раз. Размножение и получение безвирусного посадочного материала гвоздики, хризантемы, розы, бегонии ведется в цветочных хозяйствах «Элита» Российской Федерации. В Казани оздоровление и размножение посадочного материала картофеля проводится в ТатНИИСХозе и коммерческой фирме «Алчак».

Вопросы для самостоятельной работы

1. Что такое «Клональное микроразмножение растений».
2. Преимущества клонального микроразмножения растений по сравнению с традиционными методами размножения.
3. Области применения клонального микроразмножения растений.
4. Когда и для каких культур был впервые разработан метод клонального микроразмножения растений.
5. Типы клонального микроразмножения.
6. Размножение растений методом активации существующих в растении меристем.
7. Размножение растений микрочеренкованием и микроклубнями.
8. Размножение растений методом индукции возникновения адвентивных побегов.
9. Получение каллусной ткани с последующей индукцией органогенеза или эмбриоидогенеза. Недостатки этого метода клонального микроразмножения.
10. Чем обусловлена генетическая изменчивость культивируемых клеток растений?
11. Способы оздоровления посадочного материала от вирусов.
12. Основные этапы клонального микроразмножения растений.
13. Изолирование и стерилизация экспланта.
14. Химический состав питательной среды на разных этапах клонального микроразмножения растений.
15. Акклиматизация микроклонов.
16. Влияние генетических факторов на клональное микроразмножение растений.
17. Какие физические факторы влияют на размножение растений *in vitro*.
18. Роль фитогормонов в микроразмножении растений.
19. Условия, необходимые для микроразмножения растений.
20. Технические трудности клонального микроразмножения.
21. Витрификация и причины ее возникновения.
22. Эпигенетическая изменчивость растений, получаемых *in vitro*.
23. Генетическая изменчивость микроклонов.
24. Особенности размножения деревьев *in vitro*.
25. Реювенализация тканей древесных растений и ее роль в клональном микроразмножении древесных пород.

26. Методы клонального микроразмножения деревьев.
27. Размножение масличной пальмы *in vitro*.
28. Перспективы использования клонального размножения в лесной биотехнологии.

Список литературы

1. Бабикова А.В., Горпенченко Т.Ю., Журавлев Ю.Н. Растение как объект биотехнологии // Комаровские чтения. – 2007. – Вып. LV. – С. 184-211.
2. Барабин А.И. Генетика: учеб. пособие – Архангельск: Северный (Арктический) федеральный университет, 2010. – 116 с.
3. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений. – СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2002. – 232 с.
4. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
5. Биология культивируемых клеток и биотехнология растений / Бутенко Р.Г.[и др.]; под ред. Р.Г.Бутенко. – М.: Наука, 1991. – 278 с.
6. Культура клеток растений и биотехнология / Бутенко Р.Г.[и др.]; под ред. Р.Г.Бутенко. – М.: Наука, 1986. – 286 с.
7. Высоцкий В.А. Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного материала плодово-ягодных культур: Автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук. – М., 1998. – 44 с.
8. Дитченко Т.И., Спиридович Е. В., Желдакова Р. А. Культура клеток, тканей и органов растений: курс лекций. - Минск: БГУ, 2007. – 107 с.
9. Егорова, Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – М.: «Академия», 2003. – 208 с.
10. Загоскина И.В., Назаренко Л.В., Калашникова Е.А., Живухина Е.А. Биотехнология: теория и практика. Учеб.пособие. - М.: Изд. Оникс, 2009.- 496 с.
11. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. – Киев: Наукова думка, 1992. – 232 с.
12. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры ткани в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наукова думка, 1980. – 488 с.
13. Картель Н.А., Кильчевский А.В. Биотехнология в растениеводстве. – Минск: Тэхналогія, 2005. – 310 с.
14. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. – М.: Наука, 1983. – 96 с.
15. Квеситадзе Г.И., Безбородов А.М. Введение в биотехнологию. – М.: Наука, 2002. – 283 с.

16. Кузьмина Н.А. Основы биотехнологии: [Электронный ресурс]. 2005-2010. URL: <http://www.biotechnolog.ru>. (Дата обращения: 08.08.2012).
17. Лутова Л. А. Биотехнология высших растений. – СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2010. – 240 с.
18. Молканова О.И., Зинина Ю.М., Македонская Н.В., Брель Н.Г., Фоменко Т.И., Спиридович Е.В. Разработка биотехнологических приемов размножения сирени обыкновенной // Физиология и биохимия культурных растений. – 2010. – Т. 42, № 2. – С.117-124.
19. Новикова Т.И., Набиева А.Ю., Полубоярова Т.В. Сохранение редких и полезных растений в коллекции *in vitro* Центрального сибирского Ботанического сада // Вестник ВОГиС. – 2008. – Том 12, № 4. – С. 564-572.
20. Орлова И.Г. Основные пути воспроизводства культурной и дикорастущей флоры. – Ставрополь: Изд-во СГУ, 2003. – 142 с.
21. Першина Л.А. Культивирование изолированных клеток и тканей высших растений. – Новосибирск: НГУ, 2000. – 46 с.
22. Родин А.Р., Калашникова Е.А. Использование методов клеточной и генной инженерии для получения посадочного материала древесных пород. – М.: МГУЛ, 1993. – 90 с.
23. Филиппова И.П. Адвентивное почкообразование и каллусогенез у сибирских видов хвойных в культуре *in vitro*. Автореф. дис. ... к-та биол. наук. – Красноярск, 2010. – 23 с.
24. Хайруллин Р.М., Курамшина З.М. Биотехнология растений. – Стерлитамак: Стерлитамакская государственная педагогическая академия, 2008. – 39 с.
25. Черевченко Т.М., Лаврентьева А.Н., Иванников Р.В. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro* – Киев: Наукова думка, 2008. – 559 с.
26. Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Воронин Е.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология – М.: Высш. шк., 2008. – 710 с.
27. Шестибратов К.А., Лебедев В.Г., Мирошников А.И. Лесная биотехнология: методы, технологии и перспективы // Биотехнология. – 2008. – № 5. – С. 3–22.
28. Шестибратов К.А., Мирошников А.И. Лесная биотехнология: современное состояние и перспективы развития: [Электронный

ресурс]. URL: <http://www.biorosinfo.ru/Vcongress/Shestibratov.pdf>.
(Дата обращения: 08.08.2012).

ОГЛАВЛЕНИЕ

Клональное микроразмножение	3
Типы клонального микроразмножения	5
Получение безвирусного посадочного материала	19
Этапы и техника культивирования растительных тканей на разных этапах клонального микроразмножения	22
Факторы, влияющие на эффективность клонального микроразмножения	28
Проблемы и перспективы клонального микроразмножения	37
Качество растений, размножаемых <i>in vitro</i>	39
Размножение древесных растений <i>in vitro</i>	43
Вопросы для самостоятельной работы	55
Список литературы	57