

Министерство образования и науки РФ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА БОТАНИКИ И ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

Направление: 06.03.01 – биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Дипломная работа

ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ
ВОСПРОИЗВЕДЕНИЯ УПЛОТНЕНИЙ МОРФОГЕННОЙ
СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ
FAGOPYRUM TATARICUM (L.) GAERTN

Работа завершена:

«__» _____ 20__ г. _____ (М.Д. Лебедева)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель

к.б.н, младший научный сотрудник

«__» _____ 20__ г. _____ (Ю.А. Костюкова)

Научный руководитель

к.б.н, ведущий научный сотрудник

«__» _____ 20__ г. _____ (Н.И. Румянцева)

Заведующий кафедрой

д.б.н, профессор

«__» _____ 20__ г. _____ (О.А. Тимофеева)

Казань-2016

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Культура клеток и тканей высших растений	8
1.1.1 Каллусные культуры	9
1.1.2 Суспензионные культуры	13
1.1.3 Среды культивирования	19
1.2 Соматический эмбриогенез	21
1.2.1 Прямой и непрямой соматический эмбриогенез	22
1.2.2 Индукция и регуляция соматического эмбриогенеза	25
1.2.2.1 Стрессоры	25
1.2.2.2 Роль экзогенных гормонов и других соединений в индукции эмбриоидогенеза	27
1.2.3 Регуляция роста и созревания соматических зародышей	29
1.2.4 Факторы, регулирующие соматический эмбриогенез	30
1.2.4.1 Гены, вовлеченные в процесс формирования соматических зародышей	30
1.2.4.2 Экстраклеточные соединения, участвующие в регуляции соматического эмбриогенеза	31
1.2.5 Практическое применение процесса соматического эмбриогенеза	33
1.3 Гречиха татарская (<i>Fagopyrum tataricum</i> (L) Gaertn) как объект для биотехнологических исследований	33
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	37
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	37
2.1 Объект исследования	37

2.2 Снятие кривых роста. Расчет прироста биомассы по сухому и сырому весу	37
2.3 Морфологический анализ суспензионной культуры клеток <i>F. tataricum</i> (L.) Gaertn	38
2.4 Изучение особенностей роста уплотнений суспензионной культуры клеток <i>F. tataricum</i> (L.) Gaertn	38
2.5 Подготовка материала для микроскопии	38
2.6 Приготовление полутонких срезов и их окрашивание	39
2.7 Окрашивание полутонких срезов Суданом I	39
2.8 Изучение полутонких срезов	40
2.9 Приготовление ультратонких срезов, их окрашивание и изучение	40
2.10 Оценка морфогенной способности суспензионной культуры клеток <i>F. tataricum</i> (L.) Gaertn	40
3 РЕЗУЛЬТАТЫ	45
3.1 Характеристика роста суспензионной культуры <i>F. tataricum</i> (L.) Gaertn	45
3.2 Гистологическая характеристика различных фракций морфогенной суспензионной культуры <i>F. tataricum</i> (L.) Gaertn к завершению пассажа	47
3.2.1 Гистологическая характеристика мелкой фракции морфогенной суспензионной культуры <i>F. tataricum</i> (L.) Gaertn к завершению пассажа	47
3.2.2 Гистологическая характеристика средней фракции морфогенной суспензионной культуры <i>F. tataricum</i> (L.) Gaertn к завершению пассажа	49
3.2.3 Гистологическая характеристика крупной фракции морфогенной суспензионной культуры <i>F. tataricum</i> (L.) Gaertn к концу пассажа	50

3.3 Гистологические и электронно – микроскопические исследования воспроизведения уплотнений морфогенной суспензионной культуры <i>F. tataricum</i> (L.) Gaertn в течение 7 суток культивирования	52
3.3.1 Гистологические и электронно – микроскопические особенности строения и воспроизведения уплотнений морфогенной суспензионной культуры <i>F. tataricum</i> (L.) Gaertn на 3 сутки культивирования	52
3.3.2 Гистологические и электронно – микроскопические особенности строения и воспроизведения уплотнений морфогенной суспензионной культуры <i>F. tataricum</i> (L.) Gaertn на 5 сутки культивирования	54
3.3.3 Гистологические и электронно – микроскопические особенности строения и воспроизведения уплотнений суспензионной культуры <i>F. tataricum</i> (L.) Gaertn на 7 сутки культивирования	56
3.4 Изучение морфогенного потенциала суспензионной культуры <i>F. tataricum</i> (L.) Gaertn	57
4 ОБСУЖДЕНИЕ	59
ВЫВОДЫ	72
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	73
ПРИЛОЖЕНИЕ	86

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

2,4-D – 2,4-дихлорфеноксисукусная кислота

6-БАП – 6-бензиламинопурин

АБК – абсцизовая кислота

АГБ – арабиногалактановые белки

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ИУК – индолил-3-уксусная кислота

МеЖ – метилжасмонат

НУК – α -нафтилуксусная кислота

ПЭГ - полиэтиленгликоль

ПЭКК – проэмбриональный клеточный комплекс

ПЭМ – проэмбриогенные массы

ФС – фенольные соединения

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭПС – эмбриоподобные структуры

ВВЕДЕНИЕ

Суспензионные культуры представляют собой удобный объект для биохимических, физиологических, биотехнологических исследований. Преимуществом суспензионных культур, по сравнению с каллусами, является однородность и синхронность в развитии клеточных структур, а также более корректное изучение влияния каких – либо факторов на физиологию клетки, чему способствует культивирование в жидкой питательной среде.

Суспензионная культура *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. была получена в нашей лаборатории менее 2 лет назад – в июне 2014 года. В качестве экспланта был использован морфогенный каллус гречихи, который культивируется с 2005 года. Ранее было показано, что каллусы *F. tataricum* (L.) Gaertn. образованы уплотнениями – проэмбриональными клеточными комплексами (ПЭКК) и клетками мягкого каллуса, которые образуются при разрыхлении предсуществующих ПЭКК. ПЭКК представляют собой зародыши, остановленные на преглобулярной стадии развития [Тимофеева, Румянцева, 2012]. Каллусы гречихи татарской сохраняют свою морфологию, стабильный хромосомный набор в течение длительного времени культивирования (более 10 лет). Воспроизведение ПЭКК в каллусе гречихи осуществляется в результате возобновления цикла, включающего образование и рост ПЭКК, последующее разрыхление этих структур и формирование новых ПЭКК из отдельных клеток разрыхляющихся ПЭКК.

Создание стабильной морфогенной суспензионной культуры, сохраняющей длительное время регенерационный потенциал, представляет значительный научный и практический интерес. Это удобный объект для микроклонального размножения, изучения механизмов зиготического и соматического эмбриогенеза, для генетической трансформации. Кроме того, в большинстве случаев, соматические зародыши или эмбриогенные культуры могут быть криоконсервированы, что дает возможность основания генных

банков. Кроме того, суспензионная культура гречихи татарской обладает способностью продуцировать фенольные соединения (ФС), имеющие медицинское значение [Гумерова с соавт., 2015]. ФС гречихи татарской, в том числе рутины, обладают противоотечным, антиаллергическим действием, благоприятно действуют на стенки кровеносных сосудов, снижают уровень холестерина в крови, являются антидепрессантами, а также обладают антиопухоловой активностью [Panwar *et al.*, 2012].

Исследования по изучению особенностей роста морфогенной суспензионной культуры гречихи татарской нам не известны. В задачу наших исследований входило изучить процессы воспроизведения ПЭКК в суспензионной культуре гречихи татарской, поскольку условия культивирования могут нарушать механизмы, поддерживающие стабильность морфогенной культуры, вызывать морфологические и генетические изменения в культивируемых клетках. Следует отметить, что примеров аналогичных исследований, проведенных на суспензионных культурах других видов, очень мало.

Поэтому цель наших исследований – изучение гистологических и электронно – микроскопических особенностей возобновления уплотнений в морфогенной суспензионной культуре *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. снять кривую роста суспензионной культуры *F. tataricum* (L.) Gaertn и охарактеризовать ее;
2. изучить гистологические особенности строения ПЭКК и других многоклеточных структур (уплотнений) в суспензионной культуре *F. tataricum* (L.) Gaertn к концу пассажа;
3. выявить особенности воспроизведения (роста) клеточных уплотнений суспензионной культуры *F. tataricum* (L.) Gaertn в ходе пассажа;
4. оценить морфогенный потенциал суспензионной культуры *F. tataricum* (L.) Gaertn

ВЫВОДЫ

1. Изучены особенности роста морфогенной суспензионной культуры гречихи татарской. В кривой роста выделены фазы ускоренного и линейного роста, фаза замедления роста. Лаг – фазы и стационарной фазы выявлено не было. Прирост биомассы суспензионной культуры *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn за пассаж в 8 раз превышает прирост биомассы каллуса, из которого она была получена.

2. Морфогенная суспензионная культура гречихи татарской состоит из уплотнений, содержащих меристематические клетки, - ПЭКК и ЭПС, а также одиночных клеток и небольших клеточных агрегатов. Отличительной чертой ПЭКК является наличие поверхностных клеток, содержащих фенольные соединения в вакуолях. ЭПС характеризуется наличием протодермы на поверхности.

3. Новые ПЭКК и ЭПС образуются из субповерхностных клеток предсуществующих ПЭКК при разрыхлении ПЭКК, либо из протодермальных клеток ЭПС.

4. Воспроизведение уплотнений в суспензионной культуре гречихи татарской, а также степень их дифференцировки зависит от концентрации 2,4-Д в среде культивирования: при высокой концентрации 2,4-Д в среде (0-7 сут) формируются главным образом ПЭКК и значительно реже – ЭПС на глобулярной стадии развития, при снижении концентрации 2,4-Д (7-14 сут) – преимущественно ЭПС на глобулярной и постглобулярной стадиях развития, терратомы и значительно реже - ПЭКК.

5. Установлено, что суспензионная культура гречихи татарской сохраняет эмбриогенный потенциал, характерный для длительно пассируемого каллуса, из которого она была получена.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. **Адамс, Р.** Методы культуры клеток для биохимии [Текст] : [пер. с англ.] / Роджер Адамс. – М.: Мир, 1983. – 263 с. – Перевод изд. Cell Culture for biochemists / R.L.P. Adams. – Elsevier / North-Holland: Biomedical press, 1983.
2. **Акулов, А.Н.** Внеклеточные полимеры культуры клеток гречихи татарской *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. и их участие в процессах роста и морфогенеза [Текст] : дис. канд. биол. наук 03.00.12. Защищена 25.11.2006 / А.Н. Акулов; Казан. гос. ун-т. – Казань, 2006. – 162 л.
3. **Амирова, А.К.** Морфологическое и биохимическое изучение растений-регенерантов из длительнокультивируемых каллусных тканей пшеницы / А.К. Амирова, Д.Р. Манапбаев, Н.К. Бишимбаева, К.М. Булатова, Е.Д. Богданова, И.Р. Рахимбаев // Вестник КазНУ. – 2002. – №. 3. – С. 52-58.
4. **Андропова, Е.В.** Протодерма (эмбриодерма) [Текст] / Е.В. Андропова // Эмбриология цветковых растений. Семя. – 1997. – Т.2– С. 346-352.
5. **Архипова, С.С.** Колоколизация арабиногалактановых белков и фенолов в клетках проэмбриональных клеточных комплексов морфогенного каллуса и незрелых плодов гречихи татарской [Текст] / С.С. Архипова, А.Н. Акулов, Н.И. Румянцева // Структура и динамика молекулярных систем. – 2007. – Вып.1. – С. 4-7.
6. **Батыгина, Т.Б.** Хлебное зерно [Текст] / Т.Б. Батыгина. – Л.: Наука, 1987. – 103 с.
7. **Бутенко, Р.Г.** Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе [Текст] / Р.Г. Бутенко. – М.: ФКБ-ПРЕСС, 1999. – 160 с. –ISBN 5-89240-059-х.

8. **Бутенко, Р.Г.** Клеточная инженерия [Текст] / Р.Г. Бутенко, М.В. Гусев, А.Ф. Киркин, Т.Г. Корженевская, Е.Н. Маркарова. – М.: Высш. шк., 1987. – 127 с.
9. **Валиева, А.И.** Особенности состава клеточных стенок каллусных культур гречихи с различным регенерационным потенциалом в процессе роста и морфогенеза [Текст] : автореф. дис. А.И. Валиева канд. биол. наук. / А.И. Валиева; КИББ КазНЦ РАН. – Казань, 1998. – 22 с.
10. **Гао, К.** Специфичная роль *ATEXPA1* при росте и адаптации растений *Arabidopsis* к стрессу [Текст] / К. Гао, К. Лю, И.Т. Лю // Физиология растений. – 2010. – Т.57. – №. 2. – С. 254-259.
11. **Гумерова, Е.А.** Влияние метилжасмоната на характеристики суспензионной культуры гречихи татарской и накопление в ней фенольных соединений [Текст] / Е.А. Гумерова, А.А. Акулов, Н.И. Румянцева // Физиология растений. – 2015. – Т.62. – №. 2 – С. 212-221.
12. **Гумерова, Е.А.** Получение и характеристика морфогенной суспензионной культуры гречихи татарской *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn [Текст] / Е.А. Гумерова, Д.Б. Утина, Н.И. Румянцева // Ученые записки КГУ. – 2008. – Т.150. – С. 126-134.
13. **Евтушенков, А.Н.** Введение в биотехнологию [Текст] / А.Н. Евтушенков, Ю.К. Фомичев. – Мн.: Изд-во БГУ, 2002. – 105 с.
14. **Егорова, Т.А.** Основы биотехнологии [Текст] / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – М.: Академия, 2003. – 208 с. – ISBN 5-7695-1022-6.
15. **Запрометов, М.Н.** Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях [Текст] / М.Н. Запрометов. – Л.: Наука, 1993. – 271 с.
16. **Кильчевский, А.В.** Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия [Текст] / А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. – Мн.: Беларус. наука, 2012. – 489 с. – ISBN 978-985-08-1392-3.

17. **Кузьмина, Н.А.** Основы биотехнологии [Текст] / Н.А. Кузьмина. – Омск: ОмГПУ, 2006. – <http://www.biotechnolog.ru/>
18. **Кулуев Б.Р.** Перенос трансенов *ARGOS-LIKE* в *ATEXPA10* в нетрансгенные формы табака и фенотипические проявления их конститутивной экспрессии [Текст] / Б.Р. Кулуев, Е.В. Михайлова, А.В. Чемерис // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т.17. - № 1. – С. 81-88.
19. **Лукина, Ю.А.** Каллусогенез и морфогенез в культуре незрелых зародышей различных видов рода *Fagopyrum* (*Polygonaceae*) [Текст] / Ю.А. Лукина, Н.И. Румянцева // Ботанический журнал. – 1999. – Т.84. – №. 3. – С. 74-79.
20. **Лутова, Л.А.** Биотехнология высших растений [Текст] / Л.А. Лутова. – СПб.: Изд-во СПбГУ, 2010. – 227 с. – ISBN: 978-5-288-05048-0.
21. **Никитин, В.В.** Сорные растения флоры СССР [Текст] / В.В. Никитин. – Л.: Наука, 1983. – 454 с.
22. **Носов, А.М.** Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений [Текст] / А.М. Носов // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / А.М. Носов; под ред. В.В. Кузнецова, Г.А. Романова; – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – С. 386-403.
23. **Румянцева, Н.И.** Арабиногалактановые белки: участие в росте и морфогенезе растений [Текст] / Н.И. Румянцева // Биохимия. – 2005. – Вып.10. – С. 1301-1317.
24. **Румянцева, Н.И.** Органогенез и соматический эмбриогенез в культуре двух видов гречихи [Текст] / Н.И. Румянцева, Н.В. Сергеева, Л.А. Хакимова, В.В. Сальников, Е.А. Гумерова, В.В. Лозовая // Физиология растений. – 1989. – Т.36. – № 1. – С.187-194.
25. **Румянцева, Н.И.** Экстраклеточные полимеры в каллусных культурах *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. с разной морфогенной

активностью: динамика в ходе культурального цикла [Текст] / Н.И. Румянцева, А.Н. Акулов, А.Р. Мухитов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т.40. – № 5. – С. 571-578.

26. **Сибгатуллина, Г.В.** Получение и характеристика устойчивой к аминотриазолу линии морфогенного каллуса *Fagopyrum tataricum* [Текст] / Г.В. Сибгатуллина, Н.И. Румянцева, Л.Р. Хаертдинова, А.Н. Акулов, Н.Б. Тарасова, Е.А. Гумерова // Физиология растений. – 2012. – Т.59. – № 5. – С. 1-9.

27. **Сорокина, И.К.** Основы биотехнологии растений. Культура клеток и тканей [Текст] / И.К. Сорокина, Н.И. Старичкова, Т.Б. Решетникова, Н.А. Гринь. – Саратов: Изд-во СГУ, 2002. – 45 с.

28. **Суханова, Е.С.** Ростовые и биосинтетические характеристики разных штаммов культур клеток растений рода *Polyscias* [Текст] / Е.С. Суханова, Д.В. Кочкин, М.В. Титова, А.М. Носов // Вестник Поволжского государственного университета. – 2012. – Т.16. - № 2. – С. 57-66.

29. **Тимофеева, О.А.** Культура клеток и тканей растений [Текст] / О.А. Тимофеева, Н.И. Румянцева. – Казань: Изд-во КГУ, 2012. – 91 с.

30. **Титова, М.В.** Особенности дыхания и образования стероидных гликозидов в суспензионной культуре клеток *Dioscorea deltoidea* при выращивании в колбах и биореакторах [Текст] / М.В. Титова // Физиология растений. – 2015. – Т.62. - № 4. – С. 594-601.

31. **Фесенко, Н.В.** Морфологическая структура популяций как основной элемент функциональной системы экологической адаптации гречихи обыкновенной *Fagopyrum esculentum* Moench [Текст] / Н.В. Фесенко, А.Н. Фесенко, О.И. Романова // Вестник Орловского государственного аграрного университета. – 2010. – Т.25. – №. 4. – С. 47-53.

32. **Хаблак, С.Г.** Теория ферментативного роста клеток растяжением [Текст] / С.Г. Хаблак, Я.А. Абдуллаева // Экосистемы, их оптимизация и охрана. – 2013. – Т.9. – С. 175-196.
33. **Цыренов, В.Ж.** Основы биотехнологии: Культивирование изолированных клеток и тканей растений [Текст] / В.Ж. Цыренов. – Улан-Удэ: Изд-во ВСГТУ, 2003. – 58 с.
34. **Шевелуха, В.С.** Сельскохозяйственная биотехнология [Текст] / В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, Е.З. Кочиева и др. – М.: Высш. шк., 2008. – 710 с. – ISBN 978-5-06-004264-1.
35. **Широков, А.И.** Основы биотехнологии растений [Текст] / А.И. Широков, Л.А. Крюков. – Нижний Новгород: Нижегородский гос. университет, 2012. – 49 с.
36. **Шумный, В.К.** Генетика цветка и проблема совместимости у гречихи [Текст] / В.К. Шумный, Л.И. Довженко. – М.: Наука, 1988. – 192 с.
37. **Ammirato, P.V.** Induction, Maintenance, and Manipulation of Development in Embryogenic Cell Suspension Cultures [Text] / P.V. Ammirato // Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants / P.V. Ammirato; Ed. I.K. Vasil; – London: Academic Press, 1984. – V.1. – P. 139-151.
38. **Ayaydin, F.** Synchronization of *Medicago sativa* cell suspension culture [Text] / F. Ayaydin, E. Kotogany, E. Abraham, G.V. Horvath // Methods in Molecular Biology. – 2011. – V.761. – P. 227-238.
39. **Benelli, C.** Morphological and anatomical observations of abnormal somatic embryos from anther cultures of *Citrus reticulata* [Text] / C. Benelli, M.A. Germana, T. Ganino // Biologia Plantarum. – 2010. – V.54. – № 2. – P. 224-230.
40. **Bezzera, K.G.** Somatic Embryogenesis from Immature Cotyledons of Soybean. (*Glycine max* (L.) Merr.): Ontogeny of Somatic Embryos [Text] / Karla Galvao Bezzera dos santos, Jorge Ernesto de Araujo Mariath, Maria

Cecilia C. Moco, Maria Helena Bodanese-Zanettini. // J. Brazilian archives of biology and technology. – 2006. – V.49. – № 1. – P. 49-55.

41. **Bohanec, B.** Progress of buckwheat *in vitro* culture techniques with special aspect on induction of haploid plants [Text] / B. Bohanec // Current Advances in Buckwheat Research. – 1995. – V.1. – P. 205-209.

42. **Bourgaud, F.** Production of plant secondary metabolites: a historical perspective [Text] / F. Bourgaud, A. Gravot, S. Milesi, E. Gontier // Plant Science. – 2001. – V.161. – № 5. – P. 839-851.

43. **Bozhkov, P.** Polyethylene glycol promotes maturation but inhibits further development of *Picea abies* somatic embryos [Text] / P. Bozhkov, S. von Arnold // Physiologia Plantarum. – 1995. – V.104. – P. 211-224.

44. **Campanoni, P.** Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-Naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways [Text] / P. Campanoni, P. Nick // Plant Physiology. – 2005. – V.137. – № 3. – P. 939-948.

45. **Chapman, A.** Arabinogalactan-proteins in Cichorium somatic embryogenesis: effect of β -glucosyl Yariv reagent and epitope localisation during embryo development [Text] / A. Chapman, A.S. Blervacq, J. Vasseur, J.L. Hilbert // Planta. – 2000. – V.211. – № 3. – P. 305-314.

46. **Chiatante, D.** Late replicating DNA and the mechanism of 5-aminouracil induced mitotic synchronization [Text] / D. Chiatante, M.G. Galli, E. Sparvoli // Caryologia. – 1981. – V.34. – № 4. – P. 401-408.

47. **Cooper, S.** Mammalian cells are not synchronized in G1-phase by starvation or inhibition: considerations of the fundamental concept of G1-phase synchronization [Text] / S. Cooper // Cell proliferation. – 1998. – V.31. – № 1. – P. 9-16.

48. **Dantu, P.K.** Somatic embryogenesis [Text] / P.K. Dantu // Cellular and Biochemical Sciences Book / P.K. Dantu, U.K. Tomar; Ed G. Tripachi; – New Delhi: International Publishing House, 2010. – P. 893-908.

49. **David, K.** Characterization of a Tobacco Bright Yellow 2 Cell Line Expressing the Tetracycline Repressor at a High Level for Strict Regulation of Transgene Expression [Text] / K. David, C. Perrot-Rechenmann // *Plant physiology*. – 2001. – V.125. – № 4. – P. 1548-1553.
50. **de Vries, S.** Substrate Utilization by Suspension Cultures and Somatic Embryos of *Daucus carota L.* Measured by ¹³C NMR [Text] / S. de Vries, H. Booij, T. Schaafsma // *Plant physiology*. – 1988. – V.88. – № 4. – P. 1332-1337.
51. **Doležel, J.** Cell cycle synchronization in plant root meristems [Text] / J. Dolezel, J. Cihalikova, J. Weiserova, S. Lucretti, // *Methods in Cell Science*. – 1999. – V.21. – P. 95-107.
52. **Dudits, D.** Molecular biology of somatic embryogenesis [Text] / D. Dudits, J. Gyorgyey, L. Bogre, L. Bako // *Cell science*. – 1995. – V.99. – P. 475-484.
53. **Durzan, D.J.** Interpolated apomictic somatic embryogenesis, androsporogenesis, asexual heterospory, mitosporogenesis and genomic silencing in a gymnosperm artificial sporangium [Text] / D.J. Durzan // *Press Second International Conference of the IUFRO Working Party, Brno, June 25-28, 2012*. – P. 3-37.
54. **Durzan, D.J.** Somatic emryogenesis and polyembryogenesis in Douglas-fir cell suspension culture [Text] / D.J. Durzan, P.K. Gupta // *Plant Science*. – 1987. – № 52. – P. 229-235.
55. **Eastmond, P.J.** Coordinate changes in carbon partitioning and plastidial metabolism during the development of oilseed rape embryos [Text] / P.J. Eastmond, S. Rawsthorne // *Plant Physiology*. – 2000. – V.122. – №. 3. – P. 767-774.
56. **Fabjan, N.** Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as a source of dietary rutin and quercitrin [Text] / N. Fabjan, J. Rode, I.J. Kosir, Z. Wang, Z. Zhang, I. Kreft // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2003. – V.51. – № 22. – P. 6452-6455.

57. **Feher, A.** The initiation phase of somatic embryogenesis: what we know and what we don't [Text] / A. Feher // ActaBiol Szeged. – 2008. – V.52. – № 1. – P. 53-56.
58. **Feher, A.** Transition of somatic plant cells to an embryogenic state [Text] / A. Feher, T. Pasternak, D. Dudits // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2003. – № 74. – P. 201-208.
59. **Filonova, L.** Two waves of programmed cell death occur during formation and development of somatic embryos in the gymnosperm, Norway spruce [Text] / L. Filonova, P. Bozhkov, V. Brukhin, G. Daniel, B. Zhivotovsky, S. von Arnold // Journal of cell science. – 2000. – V.113. – № 2. – P. 4399-4411.
60. **Finer, J.J.** Apical proliferation of embryogenic tissue of soybean [Text] / J.J. Finer // Plant cell Reports. – 1988. – V.7. – P. 238 – 241.
61. **Flick, C.E.** Organogenesis [Text] / C.E. Flick, D.A. Evans, W.R. Sharp // Handbook of plant cell culture. – 1987. – V.1. – P. 13-81.
62. **Fujimura, T.** Synchronization of somatic embryogenesis in carrot suspension culture [Text] / T. Fujimura, A. Komamine // Plant Physiol. – 1985. – № 64. – P. 1162-1164.
63. **Gamborg, O.V.** Plant cell cultures: Nutrition and Media [Text] / P.V. Ammirato // Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants / O. Gamborg; Ed. I.K. Vasil; – London: Academic Press, 1984. – V.1. – P. 18-25.
64. **George, E.F.** Somatic Embryogenesis [Text] / E.F. George // Plant Propagation by Tissue Culture [Text] / E.F. George, A.H. Michael, G. de Klerk; Eds. E.F. George, A.H. Michael, G. de Klerk; – Netherlands: Springer Netherlands, 2008. – P. 335-354.
65. **Georget, F.** Morphohistological study of the different constituents of a babana (Musa AAA cv.Grand naine) embryogenic cell suspension [Text] / F. Georget, R. Domergue, N. Ferriere, F. Cote // Plant cell Reports. – 2000. – V.19. – P. 748-754.

66. **Gould, A.R.** Studies on the control of the cell cycle in cultured plant cells [Text] / A.R. Gould, N.P. Everett, T.L. Wang, H.E. Street // *Protoplasma*. – 1981. – V.106. – №. 2. – P. 1-13.
67. **Grimes, H.** The Role of Calcium and Calmodulin in Carrot Somatic Embryogenesis [Text] / P. Overvoord, H. Grimes // *Physiologia Plantarum*. – 1993. – V.35. – № 2. – P. 135-144.
68. **Guadarrama-Flores, B.** Production of Dihydroxylated Betalains and Dopamine in Cell Suspension Cultures of *Celosia argentea* var. plumose [Text] / B. Guadarrama-Flores, M. Rodríguez-Monroy, F. Cruz-Sosa, F. García-Carmona, F.G. Herrero // *J. Agric. Food Chem.* – 2015 – V.63. – № 10. – P. 2741–2749.
69. **Hakman, I.** A light and electron microscopy study of *Picea glauca* (White spruce) somatic embryos [Text] / I. Hakman, P. Rennie, L. Fowke // *Protoplast*. – 1987. – V.140. – P. 100-109.
70. **Halperin, W.** Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures [Text] / W. Halperin, W. Jensen // *Journal of Ultrastructure Research*. – 1967. – V.18. – P. 428-443.
71. **Hardtke, C.S.** The Arabidopsis gene *Monopteros* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development [Text] / C.S. Hardtke, T. Berleth // *EMBO J.* – 1998. – V.17. – P. 1405-1411.
72. **Hirasuna, T.J.** Enhanced anthocyanin production in grape cell culture [Text] / T.J. Hirasuna, M.L. Shuler, V.K. Lackney, R.M. Spanswick // *Plant Cell Science*. – 1991. – V.78. – P. 107-120.
73. **Hou, S.** Regeneration of buckwheat plantlets from hypocotyl and the influence of exogenous hormones on rutin content and rutin biosynthetic gene expression *in vitro* [Text] / S. Hou, Z. Sun, B. Linghu, Y. Wang, , K. Huang, D. Xu, Y. Han // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* – 2015. – V.120. – №. 3. – P. 1159-1167.

74. **Hrubcova, M.** Phenolic acids and peroxidase activity in alfalfa (*Medicago sativa*) embryogenic cultures after ethephon treatment [Text] / M. Cvikrova, M. Hrubcova, M. Vagner // *Physiologia Plantarum*. – 1994. – V.91. – № 2. – P. 226-223.
75. **Jiménez, V. M.** Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot [Text] / V.M. Jiménez, F. Bangerth // *Physiologia Plantarum*. – 2001. – V.111. – №. 3. – P. 389-395.
76. **Kakani, A.** ARR5 and ARR6 mediate tissue specific cross-talk between auxin and cytokinin in *Arabidopsis* [Text] / A. Kakani, Z. Peng // *American Journal of Plant Sciences*. – 2011. – V.2. – № 4. – P. 549.
77. **Kim, Y.K.** Production of phenolic compounds in hairy root culture of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) [Text] / Y.K. Kim, X. Li, H. Xu, N.I. Park, M.R. Uddin, J.R. Pyon, J.Y. Park // *Journal of Crop Science and Biotechnology*. – 2009. – V. 12. – №. 1. – P. 53-57.
78. **Kovarik, A.** A plant culture (BY-2) widely used in molecular and cell studies is genetically unstable and highly heterogeneous [Text] / A. Kovarik, K.Y. Lim, K. Soucková - Skalická, R. Matyasek, A.R. Leitch // *Botanical Journal of Linnean Society*. – 2012. – V.170. – P. 459-471.
79. **Kovarik, A.** Evolutionary Implications of Genome and Karyotype Restructuring in *Nicotiana tabacum* [Text] / A. Kovarik, S. Renny-Byfield, M. Grandbastien, A. Leitch // *Polyploidy and Genome Evolution* / A. Kovarik; Ed. P.S. Soltis, – Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2012. – P. 209-224.
80. **Kurczynska, E.U.** Cellular Markers for Somatic Embryogenesis [Text] / E.U. Kurczynska // *Embryogenesis* / E.U. Kurczynska, I. Potocka, I. Dobrowolska, K. Kulinska-Lukaszek, K. Sala, J. Wrobel; Ed. Dr. Ken-Ichi Sato; – Rijeka: InTech, 2012. – P. 307-332. – ISBN 978-953-51-0466-7.
81. **Lakshmanan, P.** Auxin, cytokinin and ethylene differentially regulate specific developmental states associated with shoot bud

morphogenesis in leaf tissues of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) cultured *in vitro* [Text] / P. Lakshmanan, S.K. Ng, C.S. Loh, C.J. Goh // Plant and cell physiology. – 1997. – V.38. – №. 1. – P. 59-64.

82. **Lloyd, C.W.** The mode of action of 2,4-D in counteracting the elongation of carrot cells grown in culture [Text] / C.W. Lloyd, S.B. Lowe, G.W. Peace // Journal of cell science. – 1980. – V.45. – №. 1. – P. 257-268.

83. **Lyngved, R.** Embryo-specific proteins in *Cyclamen persicum* analyzed with 2-D DIGE [Text] / R. Lyngved, J. Renaut, J. Hausman, T. Iversen, A. Hvoslef-Eide // Plant Growth Regular. – 2008. – V.27. – P. 353-369.

84. **Mayashima, S.** Stem cell function during plant vascular development [Text] / S. Mayashima, J. Sebastian, Ji-Y. Lee, Y. Healriutta // The EMBO J. – 2013. – V.32. – P. 178-193.

85. **Nelson, A.J.** Tissue fixation and staining with osmium tetroxide: the role of phenolic compounds [Text] / A.J. Nelson, W.P. Griffith // The Journal of histochemistry and cytochemistry. – 1987. – V.26. – P. 138-140.

86. **Nishi, A.** Growth and division of carrot cells in suspension culture [Text] / A. Nishi, N. Sugano // Plant and Cell Physiology. – 1970. – V.11. – № 5. – P. 757-865.

87. **Olszewska, A.J.** Analysis of mitotic synchrony induced by cold treatment in root meristems of *Vicia faba* L. [Text] / A.J. Olszewska, K. Marciniak, H. Kuran // Environmental and Experimental Botany. – V.30. – 1990. – P. 373-382.

88. **Pedroso, M.** Factors controlling somatic embryogenesis [Text] / M. Pedroso, M.S. Pais // Plant cell, tissue and organ culture. – 1993. – V.43. – № 2. – P. 147-154.

89. **Pilarska, M.** Arabinogalactan-protein and pectin epitopes in relation to an extracellular matrix surface network and somatic embryogenesis and callogenesis in *Trifolium nigrescens* [Text] / M. Pilarska,

J.P. Knox, R. Konieczny // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* – 2013. – V.115. – №. 1. – P. 35-44.

90. **Reynolds, E.S.** The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy [Text] / E.S. Reynolds // *The Journal of cell biology*. – 1963. – V.17. – №. 1. – P. 208-212.

91. **Sharma, P.** ABA associated biochemical changes during somatic embryo development in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze [Text] / P. Sharma, S. Pandey, A. Bhattacharya, P.K. Nagar, P.S. Ahuja // *Journal of plant physiology*. – 2004. – V.161. – №. 11. – P. 1269-1276.

92. **Sterk, P.** Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene [Text] / P. Sterk, H. Booij, G.A. Schellekens, S.C. de Vries // *The Plant Cell*. – 1991. – V.3. – №. 9. – P. 907-921.

93. **Swedlund, B.** Sorbitol as the primary carbon source for the growth of embryogenic callus of maize [Text] / B. Swedlund, R.D. Locy // *Plant physiology*. – 1993. – V.103. – № 4. – P. 1339-1346.

94. **Thomas, E.** Origin and Structure of Embryoids Arising From Epidermal Cells of the Stem of *Ranunculus sceleratus* [Text] / E. Thomas, R. Konar, H. Street // *Journal of cell science*. – 1972. – V.11. – P. 77-93.

95. **Toonen, M.** Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking [Text] / M.Toonen, T. Hendriks, D.L. Schmidi, H. Verhoeven, A. van Kammen , S. de Vries // *Planta*. – 1994. – V.194. – № 4. – P. 565-572.

96. **Trump, B.A.** Method for staining epoxy sections for light microscopy [Text] / B. Trump, E. Smuckler, E. Bendit // *J. Ultrastruct. Res*. – 1961. – № 5. – P. 343-348.

97. **Uddin, M.R.** Phenolic compounds in different organs of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) cultivars [Text] / M.R. Uddin, X. Li, Y.B. Kim, S.C. Chae, S.J. Kim, S.U. Park // *Australian Journal of Crop Science*. – 2013. – V.7. – № 12. – P. 1861-1865.

98. **Vroemen, C.W.** Pattern formation in the Arabidopsis embryo revealed by position-specific lipid transfer protein gene expression [Text] / C. W. Vroemen, S. Langeveld, U. Mayer, G. Ripper, G. Jurgens, A. Van Kammen, S. C. de Vries, // *The Plant Cell*. – 1996. – V.8. – №. 5. – P. 783-791.
99. **Wafa, T.** Oxidative Stress Induced by the 2,4-Dichlorophenoxyacetic Herbicide [Text] / T. Wafa // *Oxidative Stress - Environmental Induction and Dietary Antioxidants* / T. Wafa, N. Amel, C. Iqbal, H. Mohamed; Ed. V. Lushchak; – Croatia: InTech, 2012. – P. 116-130.
100. **Williams, E. G.** Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group [Text] / E.G. Williams, G. Maheswaran // *Annals of Botany*. – 1986. – V.57. – № 4. – P. 443-462.
101. **Yeung, E.** Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis [Text] / E. Yeung // *In vitro embryogenesis in plant* / E. Yeung; Ed. T.A Thorpe; – Dordrecht: Academic Publishers, 1995. – P. 205-247.