

**С.Н.Тимофеева, Ю.В.Смолькина, Н.В.Апанасова,  
О.И.Юдакова**

**ТЕХНОЛОГИИ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ  
*IN VITRO***

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ П.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

Саратовский государственный университет  
им. Н.Г. Чернышевского

С.Н.Тимофеева, Ю.В.Смолькина, Н.В.Апанасова,  
О.И.Юдакова

ТЕХНОЛОГИИ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ  
*IN VITRO*

Саратов 2016

Тимофеева С.Н., Смолькина Ю.В., Апанасова Н.В., Юдакова О.И.  
Технологии микроразмножения *in vitro*: Учеб.-метод. пособие. – Саратов, 2016. – 38 с.

В пособии рассматриваются основные аспекты культивирования растительных органов и тканей в условиях *in vitro*. Приводятся требования к оснащению биотехнологических лабораторий, касающиеся оборудования, расходных материалов, техники безопасности проведения работ. Описываются методические подходы к проведению исследований в области микроразмножения растений. Приводятся составы часто используемых питательных сред, методики приготовления маточных растворов, минеральных солей, витаминов, фитогормонов, общие принципы подбора состава питательной среды на разных этапах микроразмножения. Рассматриваются вопросы практического применения методов культуры *in vitro*. Все разделы иллюстрированы рисунками и фотографиями.

Предназначено для студентов, обучающихся по специальности 06.05.01 Биотехнология и биоинформатика, направлению подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология, направлению подготовки магистратуры 06.04.01 Биология.

Печатается по решению Ученого совета  
биологического факультета Саратовского государственного университета

Рекомендуют к печати:

Кафедра генетики Саратовского государственного университета  
Доктор биологических наук С.А. Степанов

УДК 581.143.6

© Тимофеева С.Н. и др., 2016  
© Саратовский государственный университет, 2016

## ВВЕДЕНИЕ

Размножение – свойство всех живых организмов воспроизводить себе подобных, обеспечивая тем самым непрерывность и преемственность жизни. Выделяют три основные формы размножения растений: бесполое (спорами), половое и вегетативное.

При половом размножении вследствие комбинативной изменчивости генотипы новых растений, возникающих в результате слияния родительских половых клеток (гамет), отличаются не только от генотипа родителей, но и между собой.

При вегетативном размножении новые организмы возникают путем регенерация (восстановление) целого растения из его отдельных частей (чешуй луковиц, стеблевых черенков и т.п.). В отличие от полового, при вегетативном размножении уникальные характеристики отдельного растения сохраняются. Каждое новое растение, полученное вегетативным размножением, может считаться продолжением одной особи. Несколько таких организмов образуют клон – совокупность растений, произошедших от одного общего предка путем бесполого (вегетативного) размножения.

Традиционные методы размножения растений (семенами, черенками, отводками, прививками и др.) человечество практиковало и совершенствовало в течение многих столетий. Однако до сих пор размножение многих хозяйственно-ценных или декоративных видов растений затруднено. Достижения биологии в области культивирования изолированных клеток, тканей и органов клеток и тканей привели к созданию нового метода вегетативного размножения – клонального микроразмножения, которое может быть реальной, а в ряде случаев единственной альтернативой традиционным методам размножения.

Размножение *in vitro* определяют термином «микроразмножение», поскольку в отличие от традиционных «макрометодов», оперирующих с достаточно крупными частями растений, в культуре *in vitro* размеры растительного материала невелики и варьируют от 0.2 – 0.5 до 2.0 – 5.0 см.

Процесс микроразмножения в культуре *in vitro*, как правило, включает следующие этапы:

1. отбор эксплантов, их стерилизация, подбор и оптимизация состава питательной среды, обеспечивающей наилучший рост и развитие эксплантов;
2. собственно микроразмножение – мультипликация (увеличение

- количества) побегов на среде для размножения;
3. укоренение микропобегов в стерильных условиях;
  4. перенос растений-регенерантов в условия *in vivo*.

Успешность клонального микроразмножения определяется сочетанием многих факторов: генотипом исходного объекта, эпигенетическим и физиологическим состоянием экспланта, минеральным составом питательной среды, органическими добавками, в особенности, фитогормонами, и условиями культивирования. Накопленный к настоящему времени опыт размножения растений в культуре *in vitro* свидетельствует о невозможности создания единой универсальной технологии клонирования. В каждом конкретном случае для обеспечения эффективности размножения необходимо эмпирически подбирать основные факторы культивирования.

## 1. ОРГАНИЗАЦИЯ И ТЕХНИКА ЛАБОРАТОРНОЙ РАБОТЫ

### 1.1. Устройство биотехнологической лаборатории

Все работы в лабораторных условиях проводят в отдельных, по возможности, изолированных комнатах, соответствующих определенным требованиям. Как правило, в биотехнологической лаборатории должны быть моечная комната, комната для приготовления питательных сред, автоклавная, стерильный бокс, световая и темновая культуральные комнаты. В случае необходимости допустимо функциональное объединение помещений, например, моечной и автоклавной комнат.

**Моечная комната** – должна быть оборудована раковинами/мойками, иметь подвод холодной и горячей воды, проточный (накопительный) водонагреватель, дистиллятор (для продления срока эксплуатации дистиллятора в систему предварительной водоподготовки желательно включить бытовые фильтры грубой и тонкой очистки со сменными картриджами), бутылки для хранения дистиллированной воды. Для работы с химически опасными веществами необходимо иметь вытяжку. В моечной комнате устанавливают высокотемпературные сухожаровые шкафы с набором рабочих температур +180-300°C для сушки вымытой лабораторной посуды и стерилизации горячим воздухом посуды и инструментов и автоклавы для стерилизации питательных сред и расходных материалов. Желательно использовать полностью автоматизированные автоклавы с объемом рабочей камеры не менее 30 литров. Системы электронного контроля обеспечивают стабильный термо-, баро- и временной режим работы агрегата на всех этапах стерилизации – от прогрева камеры до сброса пара и выравнивания давления, и позволяют точно следовать выбранной методике приготовления среды.

**Комната для приготовления питательных сред** оборудуется лабораторными столами, шкафами для хранения химических реактивов и чистой посуды, холодильниками для хранения маточных растворов и готовых питательных сред (рис.1). Для взвешивания химических веществ используют

весы. Точность навесок обеспечивает воспроизводимость результатов эксперимента. Для взвешивания сахарозы, агара и макроэлементов допустимо использование технических весов с точностью взвешивания до одной десятой грамма, для взвешивания солей микроэлементов, витаминов, регуляторов роста и стерилизующих веществ необходимы весы с точностью взвешивания до одной тысячной грамма.



Рис. 1. Рабочее место для приготовления питательной среды

Для приготовления питательных сред также необходим рН-метр – прибор для измерения рН питательной среды. Неоправданно высокий, равно как заниженный уровень рН приводит к тому, что после автоклавирования среда плохо застывает и не обеспечивает необходимую пространственную ориентацию эксплантов и оптимальный ионно-протонный обмен. Современной промышленностью выпускаются рН-метры как стандартного формата, состоящие из отдельного электрода и измерительного блока, так и модернизированные цифровые рН-метры объединяющие в одном корпусе цифровой элемент и ж-к индикатор, магнитные мешалки с подогревом, (диаметр платформы 150-200 мм). Кроме всех вышеперечисленных приборов необходима водяная баня, электрические плитки, автоматический дозатор для розлива среды по пробиркам.

**Автоклавная** – помещение для стерилизации сред, инструментов и материалов оборудуется сушильными шкафами для стерилизации сухим жаром, аппаратами для дистилляции и бидистилляции воды, столами и шкафами для хранения простерилизованных сред и материалов.

Для стерилизации питательных сред используют автоклавы различных моделей (рис. 2). Предпочтение следует отдавать полностью автоматизированным моделям с объемом рабочей камеры не менее 30 литров. Системы электронного контроля обеспечивают стабильный термо-, баро- и временной режим работы агрегата на всех этапах стерилизации – от прогрева камеры до сброса пара и выравнивания давления, и позволяют наиболее точно следовать выбранной методике приготовления среды.



Рис. 2. Автоклав

**«Бокс»** – комната для работ со стерильными культурами клеток, тканей и органов. Стерилизация воздуха в помещении достигается путем общего облучения бактерицидными ультрафиолетовыми лампами. Непосредственно для стерильных работ с культурой тканей используют ламинары – камеры с потоком стерильного воздуха, оснащенные встроенными УФ лампами (Рис.3). Ламинар является основным агрегатом, позволяющим в антисептических условиях проводить изоляцию и пассирование растительного материала, стерилизацию термолабильных соединений, розлив питательных сред.



Рис. 3. Обустройство рабочего места в ламинаре

**Комната для выращивания тканевых и клеточных культур** в условиях искусственного регулируемого освещения (культуральная, или ростовая комната, или «растилка») – оборудована 2-3-х ярусными стеллажами с лампами дневного света над ними (лампы прикрепляют с нижней стороны верхней полки). Люминесцентные лампы ЛД-40, ЛП-40 и т.п. обеспечивают освещенность от 2 до 5-6 тыс. люкс. Люминодатчик подключают к реле времени типа 2-РВМ для устанавливания требуемого фотопериода (продолжительности дня и ночи), чаще всего используют 16/8, соответственно.

Желательно, чтобы в комнате находилось 2-3 микробиологических термостата с регулируемым температурным режимом. Для культивирования клеточных суспензий необходимы специальные установки (качалки).

## 1.2. Посуда, инструменты, расходные материалы

**Инструменты:** для работ с культурой тканей необходимы ланцеты разные, пинцеты глазные и стоматологические, пинцеты длинные заточенные, лезвия в корнцанге, препаровальные иглы, скальпели и ножницы (глазные и обычные).

Для приготовления питательных сред необходимы автоматические пипетки переменного объема (40-200; 200-1000  $\mu$ l) и автоклавируемые наконечники соответствующего объема; мембранные фильтры Millipore с диаметром пор 0,22  $\mu$ m для приготовления стерильных растворов термолабильных гормонов, витаминов и антибиотиков; стерильные аптечные шприцы объемом 1-10мл.

**Посуда:** Для приготовления маточных растворов и питательных сред необходима мерная лабораторная посуда из боросиликатного стекла марки ТС, (термостойкое): мерные стаканы и цилиндры объемом от 25 до 2000 мл, колбы объемом от 50 до 1000 мл, а также пластиковые автоклавируемые пробирки Eppendorf на 1,5-2 мл. Для выращивания изолированных тканей используют колбы и сосуды (стеклянные или пластмассовые) объемом 100-500 мл; чашки Петри разного диаметра (стеклянные или пластмассовые одноразовые), пробирки, флаконы, стекла предметные с лункой и без лунки.

Необходимы также широкие шпатели из нержавеющей стали для забора сыпучих веществ, стеклянные палочки длиной 20-25 см для перемешивания растворов, фарфоровые стаканы объемом 500-1000 мл.

**Расходные материалы:** вата для изготовления пробок, стерилизации рук и рабочих поверхностей при работе в ламинаре; марля для оборачивания ватных пробок, изготовления мешочков для стерилизации; целлофан или пергамент для упаковывания посуды и штативов со средой при автоклавировании; бумага плотная (к примеру, бумага Крафта) и фильтровальная; пищевая пленка или Parafilm для герметизации культивационных сосудов; алюминиевая плотная фольга для колпачков пробирок и колб; штативы металлические на 40 и 100 пробирок; стерильные

хирургические и обычные резиновые перчатки; моющие средства (стиральный порошок или жидкое средство для мытья посуды).

**Химические реактивы:** неорганические соли, сахара, витамины, аминокислоты, фитогормоны, антибиотики, агар.

**Стерилизующие растворы:** этиловый спирт, диацид, гипохлорит кальция или натрия, хлорид ртути (сулема), перекись водорода и другие.

### **Практическое занятие 1. Вводное.**

1. Ознакомиться с устройством биотехнологической лаборатории.
2. Под руководством преподавателя освоить принципы работы автоклава, сушильных шкафов, дистиллятора.
3. Посуду тщательно отмыть в растворах детергентов (стиральный порошок), промыть 8–10 раз проточной водой, поместить на 4–6 часов в хромпик (смесь серной кислоты с бихроматом калия), промыть теплой водой, затем дважды ополоснуть дистиллированной.
4. Чистую посуду поместить в сушильный шкаф на 2 часа при температуре 100–120°C.
5. Сухую посуду для хранения закрыть ватными пробками, фольгой, целлофаном.

## **1.3. Создание и поддержание стерильных условий**

### **1.3.1. Работа в боксе**

Основным условием успешного культивирования является стерильность помещения для изоляции и пересадки, посуды, материалов, инструментов, посадочного растительного материала, питательной среды и т.д.

Стерилизацию помещения, посуды, инструментов осуществляют:

- влажным жаром (автоклавированием);
- сухим жаром (нагреванием в сушильных шкафах до 120-180°C);
- дробной стерилизацией – кипячением и пастеризацией;
- обработкой химическими веществами;
- облучением ультрафиолетовыми лучами.

**Стерилизацию рабочего помещения** проводят УФ-бактерицидной лампой. Ультрафиолетовое облучение убивает споры и вегетирующие формы микроорганизмов. Вследствие вредного воздействия на организм человека ультрафиолетовых лучей и образующегося озона стерилизацию облучением проводят накануне работы (вечером) на протяжении 1,5-2 ч.

**Стерилизация ламинара.** При работе в ламинаре стерильность обеспечивается бактерицидной лампой и стерильным потоком воздуха. Перед началом работы рабочую поверхность стола протирают 96° спиртом, после чего включают УФ-излучение на 40 мин. Для работы в ламинар-боксе сотрудник надевает лабораторный халат и шапочку, руки обрабатывает 96 % спиртом и надевает стерильные хирургические перчатки.

**Стерилизация посуды и материалов.** Для стерилизации посуду необходимо определенным образом подготовить. Вымытые и высушенные колбы и цилиндры плотно накрывают крышечками из алюминиевой фольги, сверху - колпачком из пергаментной бумаги и надежно фиксируют шпагатом. Пробирки плотно укупоривают ватно-марлевыми пробками, расставляют в штативы, закрывают сверху целлофаном или пергаментной бумагой (чтобы предотвратить намокание пробок). Чашки Петри поштучно плотно заворачивают в пергаментную бумагу. Чистые просушенные пробирки Ependorf и пластиковые наконечники для пипеток помещают в любую термостойкую посуду (стеклянные банки на 250-300 мл, в которых умещается 20-25 пробирок), плотно закрывают крышкой из алюминиевой фольги, сверху колпачком из пергаментной бумаги и фиксируют шпагатом.

Подготовленную посуду, вату, марлю, ватные пробки, бумагу можно стерилизовать как в автоклаве, так и в сухожаровом шкафу. Как правило, режим стерилизации составляет: в сухожаровом шкафу при стерилизации сухим жаром - 2 ч при температуре 150°C, в автоклаве при стерилизации влажным жаром – 1 час при 1.5 атм и температуре 180-200°C.

Стерилизация влажным паром при автоклавировании более надежна и чаще используется на практике. Однако при стерилизации бумаги автоклавированием бумага, как правило, отсыревает и проавтоклавированные пачки бумаги или свертки с чашками Петри необходимо дополнительно просушить при комнатной температуре в течение 1-2 суток, что необходимо учитывать при подготовке эксперимента.

**Стерилизация растворов термолабильных веществ** (фитогормонов, витаминов и антибиотиков) проводят в стерильных условиях ламинар-бокса. Приготовленный для фильтрации раствор набирают в стерильный аптечный шприц, на наконечник которого плотно надевают префильтр. Затем, распечатав стерильную упаковку одноразового фильтра, плотно присоединяют его к префильтру, сидящему на шприце. Медленно пропускают раствор через фильтр в стерильную колбу или пробирку, закрывают ее стерильным фольговым колпачком и герметизируют пленкой или Parafilm-ом. Колбу подписывают с указанием даты фильтрации, хранят в холодильнике.

**Стерилизацию инструментов** осуществляют в два-три этапа. Предварительную стерилизацию инструментов проводят нагреванием в сушильном шкафу в течение 2 час при 140°C. Автоклавировать металлические инструменты нельзя, так как под действием пара они тупятся и ржавеют. Непосредственно перед работой инструменты можно еще простерилизовать ультрафиолетом в процессе облучения ламинара. Кроме того, в процессе работы инструменты дополнительно стерилизуют неоднократным обжигом в пламени спиртовки. Каждый инструмент (скальпели, пинцеты, иглы) следует обжигать индивидуально. Работать «горячим» инструментом нельзя, необходимо дождаться, чтобы он остыл. Для этого его помещают между двумя листами стерильной автоклавированной бумаги. Комплект инструментов составляет 3-5 скальпелей, 5-7 пинцетов, 10 препаровальных игл.

## **Практическое занятие 2. Порядок работы в боксе.**

**Материалы и оборудование:** ламинар-бокс, 70 и 96 % спирт, вата, спиртовка, спички, комплект инструментов, стерильная бумага, инструменты, культуральные сосуды (пробирки, колбы или чашки Петри) с питательной средой, Parafilm.

### **Ход работы.**

1. Приступая к работе в боксе, руки, рабочие поверхности ламинара и близкорасположенные предметы протереть 96° спиртом, инструменты обжечь в пламени спиртовки.

2. После стерилизации обжиганием каждый инструмент помещают между листами простерилизованной в автоклаве плотной бумаги. Стерильный инструмент используется для одно-трехразовой манипуляции. Затем его снова следует простерилизовать спиртом и обжечь.

1. После окончания работы в боксе следует покрыть пробки культуральных сосудов целлофаном, боковые грани чашек Петри герметизировать Parafilm'ом и поместить их в культуральную комнату (растилку).

2. Продезинфицировать рабочие столы разбавленным спиртом, убрать использованную бумагу, вату и т.п.

### **1.3.3. Стерилизация растительного материала**

Подбор условий стерилизации является важным этапом всех работ по культуре изолированных клеток, тканей и органов. Выбор стерилизующего вещества, его концентрацию и время воздействия определяют в зависимости от типа ткани и степени ее инфицированности. При введении в культуру *in vitro* стерилизующее вещество и время воздействия подбирают таким образом, чтобы уничтожить патогенные микроорганизмы/грибы и при этом значительно не повредить ткани экспланта.

Этиловый спирт часто применяют для предварительной стерилизации, погружая растительный материал на несколько секунд в 70°С спирт.

В практике лабораторной работы для поверхностной стерилизации растительного материала чаще всего используют растворы, содержащие активный хлор (гипохлорит кальция или натрия, хлорамин) или ртуть (диацид, сулема), реже – перекись водорода, нитрат серебра, антибиотики.

**Хлор-содержащие растворы** используются 1 раз и готовят их непосредственно перед работой.

**Гипохлорит кальция** ( $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ ) используется в виде 5–7 % раствора для обработки почек, завязей, цветков, семян, побегов в течение 5–8 минут.

**Гипохлорит натрия** ( $\text{NaClO}$ ) используется в виде 0.5-5.0 % раствора для стерилизации любых типов эксплантов в течение 1–20 минут. Для изолированных почек используют 2–3 % раствор в течение 10–15 минут, а для сухих семян 3–5 % раствор в течение 1 часа. Это вещество является клеточным ядом, поэтому концентрацию и время обработки подбирают индивидуально. Остатки гипохлорита натрия сначала удаляют 0.01 н HCl, а затем несколько раз

раз промывают автоклавированной дистиллированной водой, затем промывают стерильной дистиллированной водой 2-3 раза.

В последние годы исследователи предпочитают использовать в работе уже готовые коммерческие хлор-содержащие растворы: «Белизна» или «Domestos» отечественного производства. В каждом конкретном случае требуется эмпирический подбор концентраций (разведение водой в соотношении, например, 1:2 или 1:10) и времени обработки (2-20 мин).

**Хлорамин Б** ( $C_6H_5SO_2N(NaCl) \cdot H_2O$ ) применяют в 1–6 % концентрации. Пыльники и молодые зародыши обрабатывают в течение 1–3 минут, сухие семена – 30–60 минут.

**Ртуть-содержащие растворы**, как правило, обеспечивают более высокую эффективность стерилизации, однако при этом может происходить гибель значительной части первичных эксплантов (от  $\frac{1}{3}$  до  $\frac{1}{2}$  от общего количества). Ртуть-содержащие растворы используют многократно, хранят в плотно закрытой колбе в темноте. Ртуть в составе стерилизующего раствора является токсичным веществом и требует осторожности и тщательности, как при хранении, так и при подборе концентрации и экспозиции (необходимо работать в перчатках, под вытяжкой).

**Сулема**,  $HgCl_2$  – чаще всего используют как 0,1 % раствор в различной экспозиции. Продолжительность воздействия для стерилизации зародышей составляет 1–3 мин, для листьев, почек, апексов побегов – от 10 до 20 мин.

**Диацид** – комплексный препарат, готовят из двух компонентов, растворяя отдельно 330 мг этанолртутихлорида и 660 мг цетилпиридиния хлорида в горячей воде, затем оба раствора смешивают и доводят объем жидкости до 1 л, добавляют несколько капель детергента Твин-80. Диацид широко используют для стерилизации семян, кусочков, тканей, верхушечных меристем, изолированных зародышей, пыльников. В каждом конкретном случае требуется эмпирический подбор времени обработки (2-20 мин).

**Антибиотики** применяют для стерилизации растительного материала, инфицированного бактериями. Наиболее часто применяют стрептомицин и тетрацилин в концентрации 10-80 мг/л, ампициллин в концентрации 200-400 мг/л, а также левомецитин или канамицин.

### **Практическое занятие 3. Стерилизация растительного материала.**

**Материалы и оборудование:** стерильные стаканчики объемом 50 мл, стерильные чашки Петри, пробирки с питательной средой, колбы с автоклавированной дистиллированной водой, колбы со стерилизующими растворами, семена сорго, ламинар-бокс, 70 и 96 % спирт, вата, спиртовка, спички, комплект инструментов, стерильная фильтровальная бумага.

#### **Ход работы.**

1. Отобрать 150 полноценных, выполненных семян сорго.
2. В ламинар-боксе поместить семена в стаканчики со стерилизующими растворами по 20-30 семян в каждую (6 % хлорамин, «Domestos» (1:1) и (1:5),

96 % спирт, сулема 0,1 %, перекись водорода 33 %). Время стерилизации подобрать экспериментально.

3. Отмыть семена от стерилизующих растворов 3 порциями стерильной дистиллированной воды.

4. Поместить семена в стерильные чашки Петри на стерильную фильтровальную бумагу, чтобы удалить остатки промывочных вод.

5. Обсушенные семена поместить в пробирки, на поверхность питательной среды, не заглубляя.

6. Пробирки поставить в штативы, перенести в ростовую комнату для проращивания.

7. Результаты опыта зарисовать через неделю. Сделать выводы об эффективности стерилизующих растворов.



Рис. 4. Результаты культивирования семян сорго после различных вариантов стерилизации (слева направо): 1 – полное подавление прорастания, 2 – частичное подавление прорастания, 3 – бактериальная инфекция, 4 – грибная инфекция, 5 – частичное подавление прорастания, 6 – нормальный проросток без признаков инфекции

### 1.3.3. Дезинфекция культивируемого материала

Поверхностная стерилизация эксплантов и выбраковка явно зараженных культур в процессе первичного культивирования могут лишь устранить инфицирующие организмы. Те же микроорганизмы, что имеют более сбалансированные взаимоотношения с клетками растений, могут остаться необнаруженными. В их число входят такие часто встречаемые патогены, как вирусы, некоторые бактерии и микоплазмы. В процессе последующего культивирования, могут проявляться признаки внутренней инфекции, когда начинают развиваться бактерии, ассоциированные с внутренними тканями экспланта. Визуально это выражается в появлении белесого налета на поверхности питательной среды или мутного ореола вокруг эксплантов в месте их контакта с питательной средой. Активизация внутренней инфекции

приводит к некрозу культивируемых тканей, замедлению роста и развития побегов и корней, и в целом снижает эффективность микроразмножения.

В этом случае необходимо провести «очистку» материала путем культивирования его на питательной среде с добавлением антибиотика. Чаще всего используют следующие антибиотики:

- **канамицин** – растворяют в концентрации 10 мг/мл в дистиллированной H<sub>2</sub>O и стерилизуют фильтрованием. Хранят до 1 мес при 4°C или в замороженном виде при -20°C;

- **рифампицин** – растворяют в метаноле в концентрации 20мг/мл. Помещают навеску рифампицина в стерильную стандартную пробирку, добавляют метанол, закрывают пробирку и встряхивают. Хранят до 3 мес при -20°C;

- **тетрациклин** – растворяют в концентрации 10 мг/мл в дистиллированной H<sub>2</sub>O и стерилизуют фильтрованием. Хранят до 1 мес при 4 °C или в замороженном виде при -20°C;

- **стрептомицин** – растворяют в дистиллированной H<sub>2</sub>O в концентрации 50 мг/мл и стерилизуют фильтрованием. Хранят при -20°C;

- **нистатин** – растворяют в метаноле в концентрации 10 мг/мл непосредственно перед использованием, так как нистатин нестабилен при хранении;

- **цефотаксим** – растворяют в дистиллированной H<sub>2</sub>O в концентрации 50 мг/мл и стерилизуют фильтрованием. Хранят при -20°C. Добавленный в питательную среду цефотаксим разрушается на свету через 3 дня.

Растворы антибиотиков готовят в стерильных условиях ламинара. Для этого в аптечный пузырек с порошком антибиотика, например 1г карбенициллина, стерильным шприцем вводят 2 мл дистиллированной стерильной воды и хорошо перемешивают. Необходимое количество стерильного раствора антибиотика (концентрацию подбирают эмпирическим путем) добавляют при помощи автоматической пипетки со стерильными пластиковыми наконечниками к жидкой питательной среде (охлажденной после автоклавирования до температуры +40°C), после чего среду разливают по пробиркам или чашкам Петри.

Культуры с внешними признаками внутренней инфекции очищают от загнивших и отмерших частей до здоровой ткани, помещают на среду с добавлением антибиотика и культивируют 5-7 дней. После указанного срока проводят второе пассирование (перенос) на среду с антибиотиком, снова удалив перед этим отмершие ткани. Такое пассирование проводят неоднократно, обычно 3-5 раз, до исчезновения признаков инфекции.

#### ***Практическое занятие 4. Техника изоляции (вычленения) первичных эксплантов на примере зародышей из зерновок кукурузы.***

**Материалы и оборудование:** стерильные стаканчики объемом 50 мл, пробирки с питательной средой, колбы с автоклавированной дистиллированной водой, колба со стерилизующим раствором, зерновки кукурузы, ламинар-бокс,

70 и 96 % спирт, вата, спиртовка, спички, комплект инструментов, стерильная фильтровальная бумага.

#### **Ход работы.**

1. Отобрать 50 здоровых зерновок кукурузы, простерилизовать в 6 % раствор хлорамина 10 минут, промыть тремя порциями стерильной дистиллированной воды.

2. Зерновку поместить на лист бумаги под целлофан.

3. Придерживая зерновку пинцетом, надрезать оболочку вокруг зародыща скальпелем.

4. Надавить на зародыш (на границе с эндоспермом) и вычленить его из зерновки.

5. Взять из штатива пробирку с питательной средой, снять пробку. Пробирку держать открытой частью от себя.

7. Пинцетом перенести зародыш на поверхность питательной среды щитком вниз (не заглублять).

8. Пробирку и горлышко пробирки обжечь на пламени спиртовки, пробирку закрыть.

9. Пробирки с зародышами поставить в штатив и перенести на стеллаж в ростовую комнату.

10. Проростки зарисовать через 2 и 4 недели. Оценить качество посадки.

### **1.4. Искусственная питательная среда**

Компоненты среды для выращивания растительных клеток и тканей можно разделить на 2 основные группы:

- **неорганические соединения** – минеральные соли (макро- и микроэлементы), источники железа (обычно в хеллатной форме);
- **органические соединения** – источник углеводного питания (обычно сахара или глюкоза), витамины (чаще всего используют В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub>, РР и С), растительные экстракты.

Для роста и дифференцировки любых растительных клеток необходимы фитогормоны – ауксины, цитокинины и гибберелины.

В состав некоторых питательных сред входят гидролизат казеина, дрожжевой экстракт, аминокислоты, жидкий эндосперм кокосового ореха (кокосовое молоко), овощные и фруктовые соки (томатный, яблочный и др). Такие растительные экстракты имеют неопределенный состав и содержат аминокислоты, витамины, природные фитогормоны.

Для приготовления твердых питательных сред в качестве уплотняющего вещества используют агар-агар – полисахарид, получаемый из морских водорослей, который при рН 5.6-6.0 образует с водой гель, плавящийся при 100°C и затвердевающий при 45°C. Кроме того, в качестве уплотнителя питательной среды и заменителя агар-агара используют биогели, силикогели, полиакриламидные гели (Р10 и Р200).

В культуре *in vitro* применяют и жидкие среды (без добавления отвердителя) для культивирования суспензий клеток, каллусов, изолированных органов и тканей, растений-регенерантов. Для поддержания эксплантов в определенной пространственной ориентации в пробирки с жидкой средой помещают специальные мостики-поддержки из фильтровальной бумаги или синтетических пористых материалов.

pH питательной среды является важным фактором, определяющим эффективность культивирования. Неоправданно высокий, равно как заниженный уровень pH приводит к тому, что после автоклавирования среда плохо застывает и не обеспечивает необходимую пространственную ориентацию эксплантов и оптимальный ионно-протонный обмен.

#### 1.4.1. Состав питательной среды; неорганические компоненты

В естественных условиях *in vivo* азот, фосфор, сера входят в состав органических соединений: белков, жиров, нуклеиновых кислот. Железо, цинк, марганец, молибден, кобальт в сочетании с порфиринами образуют макромолекулы пигментов фотосинтеза (хлорофилла), окислительно-восстановительных ферментов (каталазы, пероксидазы, полифенолоксидазы).

Все вышеуказанные соединения выполняют в клетках и тканях структурную функцию. В то же время ионы  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$ ,  $H^+$  необходимы для регуляции pH внутренней среды и поддержания физиологических градиентов клеток (тургора, осмотического давления, полярности).

При культивировании *in vitro* необходимо обеспечить доступ всех вышеуказанных веществ в изолированные ткани эксплантов. Азот может вводиться в питательную среду в форме нитратов, нитритов, солей аммония; фосфор – в форме фосфатов; сера – в форме сульфатов; а также растворимых солей  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ . Железо, в виде неорганических солей или солей органических кислот, наиболее часто вводится в комплексе с хелатирующими агентами, например с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА). Это позволяет улучшить доступности железа в широких пределах pH, поскольку pH среды влияет на усвояемость железа.

В настоящее время известно большое число различных по минеральному составу питательных сред. Наиболее часто для инициации, роста и развития изолированных растительных тканей в условиях *in vitro* используют среду по Мурасиге и Скугу (MS). Данная среда была разработана для культивирования изолированных тканей *Nicotiana tabacum*. Эта среда содержит хорошо сбалансированный состав питательных веществ и отличается от других соотношением аммонийного и нитратного азота.

Из многочисленных обзоров по культуре растительных тканей известно, что питательную среду можно подобрать в зависимости от объекта культивирования (травянистый или древесный вид, одно- или двудольный вид и т.п.) и типа первичного экспланта (пыльник, листовая диск или вегетативная почка). Так, для культивирования пыльников двудольных растений используют среду Нич и Нич (NN), пыльников однодольных растений – среду MS. Для

выращивания тканей травянистых растений используют среду Уайта, Гамборга В5, N6. Для культивирования древесных растений часто используют среды Кворина-Лепувра (QL), Дравера и Кануки (DKW), Woody Plant Medium (WPM). Минеральный состав наиболее часто используемых сред представлен в Приложении (табл. 1).

#### 1.4.2. Состав питательной среды; органические добавки

В качестве источника углерода в питательные среды добавляют углеводы в концентрации 10–60 г/л. Обычно это дисахариды (сахароза), моносахариды (гексозы: глюкоза и фруктоза, пентозы: ксилоза и другие). Полисахариды в питательных средах практически не используются.

Для стимуляции биохимических реакций в культивируемых клетках и тканях используют биологические катализаторы – витамины группы В (такие как В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub>), С (аскорбиновую кислоту), РР (никотиновую кислоту), мезоинозит, глицин. Другие витамины (биотин, Са – пантотенат, цианокобаламин и др.) используют реже.

В<sub>1</sub> (тиамин) входит в состав пируватдекарбоксилазы, участвует в превращениях углеводов. Тиаминпирофосфат входит в состав ферментов окислительного декарбоксилирования кетокислот (пировиноградной и кетоглутаровой), кроме того является коферментом транскетолазы.

В<sub>6</sub> (пиридоксин) в виде фосфорнокислого эфира входит в состав ферментов декарбоксилирования и переаминирования аминокислот.

РР (никотиновая кислота) в виде амида входит в состав дегидрогеназ НАД и НАДФ, катализирующих донорно-акцепторную цепь Н<sup>+</sup> (отнятие ионов Н<sup>+</sup> от молекул органических веществ).

Аскорбиновая кислота и глицин являются веществами с выраженными антиоксидантными свойствами, что облегчает культивирование *in vitro*.

Концентрации витаминов в среде варьируют от 0.1 до 5.0 мг/л. Большинство витаминов термостабильны, однако некоторые (аскорбиновая кислота) разрушаются во время автоклавирования, поэтому их вводят в среду после стерильной фильтрации.

#### 1.4.3 Состав питательной среды, фитогормоны

Фитогормоны – это биологические регуляторы роста и развития растений, осуществляющие взаимодействие клеток, тканей и органов, стимулирующие и ингибирующие морфогенетические и физиологические процессы в растительных организмах. В условиях *in vivo* фитогормоны влияют на деление и рост клеток растяжением; состояние покоя, созревание, старение, устойчивость к стрессу, тропизмы, транспирацию; обеспечивают функциональную целостность растительного организма, закономерную последовательность фаз индивидуального развития. В культуре *in vitro* фитогормоны, добавленные в питательные среды в различных концентрациях и

сочетаниях, регулируют синтез эндогенных гормонов растений, что проявляется в разнообразных морфогенетических реакциях клеток и тканей. Фитогормоны способны изменять проницаемость клеточных мембран. Под действием ауксинов и гиббереллинов усиливается выброс протонов из клетки, что приводит к подкислению клеточной стенки и ослаблению связей между целлюлозными фибриллами в результате частичного кислотного гидролиза пектиновых веществ. Поэтому клеточная стенка становится более эластичной и под действием тургорного давления вакуоли клетка приобретает способность к растяжению.

По химической природе фитогормоны четко подразделяются на две группы: производные мевалоновой кислоты (цитокнины, гиббереллины, абсцизины), производные аминокислот (ауксины – из триптофана, этилен – из метионина и аланина).

По функциональному воздействию различают 5 основных групп фитогормонов: ауксины, цитокнины, гиббереллины, абсцизины и этилен. Помимо «классических» фитогормонов, для растений известны другие эндогенные вещества, в ряде случаев действующие подобно фитогормонам. Это brassinosteroids, (липо)олигосахарины, жасмоновая кислота, салициловая кислота, пептиды, полиамины, а также фенольные ингибиторы роста. Вместе с фитогормонами их обозначают общим термином «природные регуляторы роста растений».

**Ауксины** в культуре изолированных тканей вызывают рост клеток растяжением, формирование корней, в больших концентрациях – деление клеток и образование каллусной ткани, в сочетании с цитокнинами – органогенез. Из «природных» ауксинов наиболее часто используют  $\beta$ -индолилуксусную кислоту (ИУК), из синтетических ауксинов – 2,4-дихлорфенилуксусную кислоту (2,4-Д),  $\beta$ -индолилмасляную кислоту (ИМК),  $\alpha$ -нафтилуксусную кислоту (НУК). Первичное действие ауксинов направлено на изменение активности (активацию или репрессию) определенного набора компетентных генов, характерного для данной ткани. ИУК также активирует АТФазу плазмалеммы, вызывая выкачивание протонов из клетки и закисление клеточной стенки. Это приводит к размягчению матрикса стенки, что делает возможным рост клеток растяжением.

**Цитокнины** и вещества с цитокниновой активностью в культуре тканей индуцируют пролиферацию клеток, почек и побегов. Совместно с ауксинами активируют деление клеток, стимулируют развитие боковых побегов (снятие апикального доминирования), способствуют клеточной дифференцировке и формированию побегов. К природным цитокнинам относят: зеатин (6-(4-окси-3-метил-2-бутенил)-аминопурин, кинетин (6-фурфуриламинопурин), NN-дифенилмочевина (в составе кокосового молока); к синтетическим – 6-БАП (6-бензиламинопурин), тидиазурон (N-фенил-N-1,2,3,-тидизолил-5-мочевина), 2 iP (2-изопентиладенин), 4PU (2-хлор-4-пиридил-N-фенилмочевину). Действие цитокнинов связано с изменением активности

(активацией или репрессией) определенного набора компетентных генов, характерного для данной ткани.

**Гиббереллины** стимулируют деление и растяжение клеток меристематических зон, а также синтез ауксинов и цитокининов. По химической природе — дитерпеновые тетрациклические кислоты. Известно более 60 гиббереллинов, хотя лишь немногие из них имеют собственную биологическую активность (ГК<sub>1</sub>, ГК<sub>3</sub>, ГК<sub>4</sub>, ГК<sub>7</sub>). В культуре ткани преимущественно используется ГК<sub>3</sub>, гибберелловая кислота

**Абсцизины** (АБК – абсцизовая кислота) и **этилен** ингибируют ростовые процессы и деление клеток, поэтому при микроразмножении практически не используются.

Краткая характеристика фитогормонов представлена в Приложении (Табл.2).

При культивировании *in vitro* фитогормоны, добавленные в питательную среду в различных концентрациях, сочетаниях и соотношениях, влияют на дифференциацию и дедифференциацию клеток и тканей, индуцируют деление и растяжение клеток, и в целом либо стимулируют, либо ингибируют рост и развитие культур.

В 1955 г. Скуг и Миллер предложили гипотезу гормональной регуляции в культуре клеток и тканей. Если концентрация ауксинов и цитокининов в питательной среде относительно равны или концентрация ауксинов незначительно превосходит концентрацию цитокининов, то образуется каллус; если концентрация ауксинов значительно превосходит концентрацию цитокининов, то формируются корни; если концентрация ауксинов значительно меньше концентрации цитокининов, то образуются почки, побеги.

Как правило, концентрации и соотношения фитогормонов, индуцирующих органогенез, варьируют в широких пределах и для каждого вида подбираются индивидуально.

#### 1.4.4. Приготовление питательной среды

Приготовление питательной среды начинается с приготовления концентрированных (так называемых маточных) растворов макро- и микросолей, источников железа и кальция, а также рабочих растворов фитогормонов и витаминов. В практической работе использование предварительно подготовленных маточных и рабочих растворов значительно экономит время, особенно при больших объемах работ.

**Приготовление маточных растворов минеральных солей по MS (500 мл):** В колбу с небольшим количеством дистиллированной воды (~ 200 мл) поочередно добавляют навеску по прописи питательной среды, немного нагревают до растворения кристаллов или порошка, доводят конечный объем в мерном цилиндре до 500 мл. Внимание: CaCl<sub>2</sub> необходимо растворить отдельно, в случае несоблюдения этого условия, образуется нерастворимый осадок, раствор макросолей придется переделывать.

- $\text{NH}_4\text{NO}_3$  - 16,5 г.
- $\text{KNO}_3$  – 19 г.
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 3,7 г или  $\text{MgSO}_4$  – 1,8 г.
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,7 г.
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 4,4 г или  $\text{CaCl}_2$  – 3,325 г – растворить в воде в отдельном стаканчике при нагревании, после чего долить к общему раствору.

Полученный раствор должен быть прозрачным. На 1 л среды MS добавляют 50 мл приготовленного раствора

**Приготовление маточного раствора микросолей по MS (100 мл):**

- $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   
Приготовить раствор 250мл/100мл, добавить 10 мл этого раствора в 100 мл маточного раствора микросолей.
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$   
Приготовить раствор 250мл/100мл, добавить 1 мл этого раствора в 100 мл маточного раствора микросолей.
- $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 620 мг
- $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 2,23 г, или  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 2,41 г, или  $\text{MnSO}_4$  – 1,51 г.
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 860 мг
- КJ  
Приготовить раствор 830 мг/100мл, добавить 10 мл этого раствора в 100 мл маточного раствора микросолей.
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$   
Приготовить раствор 250 мл/100мл, добавить 1 мл этого раствора в 100 мл маточного раствора микросолей.

Полученный раствор должен быть прозрачным. На 1 л среды MS добавляют 1 мл приготовленного раствора.

**Приготовление маточного раствора Fe-хеллата:**

Fe-хелат (Fe – ЭДТА) можно приготовить следующим образом:

- 2.785 г  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  растворить в 200 мл дистиллированной воды;
- 3.725г  $\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  растворить в 200мл дистиллированной воды;
- слить оба раствора и довести объем до 500 мл.

Полученный раствор должен быть желтого цвета. На 1 л среды MS добавляют 5 мл приготовленного раствора.

**Приготовление рабочих растворов фитогормонов:**

Фитогормоны, как правило, плохо растворяются в воде. Поэтому предварительно 100 мг вещества растворяют в небольших количествах (0,5–2,0 мл) 96 ° спирта (ауксины), 0,5-1 н NaOH (цитоконины), затем подогревают до полного растворения (кроме абсцизовой кислоты и кинетина) и доводят до 100 мл объема. Для удобства в работе лучше готовить рабочие растворы, содержащие 1 мг действующего вещества в 1 мл конечного раствора.

### ***Приготовление раствора 6-БАП***

Навеску 6-бензиламинопурина (50 мг) растворить без остатка в небольшом количестве спирта (1-2 мл) при подогреве на водяной бане, затем довести до нужного объема (50 мл) горячей дистиллированной водой (+70°C). При возможном выпадении кристаллов БАП в осадок, раствор следует нагревать до полного исчезновения осадка, постоянно перемешивания, что существенно ускоряет растворение.

### ***Приготовление раствора ИМК***

Навеску ИМК (50 мг) предварительно растворяют в небольшом количестве щелочи (1-3 мл 1н NaOH) и затем доводят объем раствора до 50 мл. Индолилмасляная кислота хорошо растворяется без подогрева.

### ***Приготовление раствора гибберелловой кислоты (ГК)***

Навеску гибберелина массой 50 мг растворить в 50 мл теплой дистиллированной воды.

### ***Приготовление раствора абсцизовой кислоты (АБК)***

Навеску АБК (50 мг) растворить в небольшом объеме 70°спирта, довести объем раствора до 50 мл дистиллированной водой.

### **Приготовление растворов витаминов:**

Все витамины хорошо растворяются в дистиллированной воде. Для удобства в работе лучше готовить рабочие растворы, содержащие 1 мг действующего вещества в 1 мл конечного раствора.

### ***Приготовление раствора витаминов из порошка***

Навеску витамина массой 50 мг растворить в 50 мл теплой дистиллированной воды.

### ***Приготовление раствора витаминов из готовых аптечных препаратов***

Чаще всего 1 ампула содержит 50 мг действующего вещества в 1 мл раствора (в перерасчете на 100%вещество). В мерный цилиндр поместить небольшое количество дистиллированной воды, добавить туда же содержимое одной ампулы, довести объем раствора до 50 мл дистиллированной водой.

### **Приготовление питательной среды:**

*Общепринятая схема:* навеску агара помещают в термостойкую колбу с холодной дистиллированной водой (1/2 объема среды) на 10-15 мин для набухания, затем нагревают до полного растворения агара. В стакан с небольшим количеством дистиллированной воды добавляют необходимый объем маточных растворов минеральных солей, рабочих растворов витаминов. Навески сухих веществ: мезоинозита и сахарозы растворяют в небольшом

количестве воды и смешивают с раствором солей. Объединяют полученный раствор с расплавленным агаром, переливают в мерный цилиндр и доливают дистиллированной водой до конечного объема. Добавляют необходимое количество фитогормонов. Затем измеряют рН раствора и доводят его до нужного значения, добавляя по каплям 1 н NaOH или HCl.

Термолабильные добавки (некоторые гормоны, витамины или антибиотики) вводят после автоклавирования в охлажденную до 40<sup>0</sup>С среду в стерильных условиях ламинара.

### ***Практическое занятие 5. Приготовление 1 литра питательной среды MS.***

**Материалы и оборудование.** Химические стаканы, колбы, мерные цилиндры от 25 до 1000 мл, пробирки, автоматические пипетки со сменными наконечниками, весы, шпатели, электроплитка, химические реактивы, предварительно приготовленные маточные растворы макро- и микросолей, витаминов, фитогормонов.

#### **Ход работы.**

1. В термостойкую колбу с холодной дистиллированной водой (400 мл) поместить 7 г агара, оставить на 10-15 мин для набухания, затем нагреть при помешивании до полного растворения агара

2. В химический стакан емкостью 600 мл поместить 20 г сахарозы, долить дистиллированной водой до 200 мл, нагревать на плитке до полного растворения, постоянно помешивая раствор стеклянной палочкой.

3. Последовательно добавить к раствору сахарозы 50 мл маточного раствора микросолей, 1 мл микросолей, 5 мл хелата железа.

4. К раствору сахарозы и минеральных солей добавить 100 мг мезоинозита, 2 мл глицина и по 0.5 мл рабочих растворов витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub> и РР.

5. Объединить полученный раствор с расплавленным агаром, перелить в мерный цилиндр и долить дистиллированной водой до 1 литра.

6. Добавить необходимое количество фитогормонов.

7. Измерить рН раствора и довести его до 5.8. Если рН превышает 5,5–6,0 добавляют несколько капель 0,1 н HCl, если ниже этого значения – 1 н NaOH

8. Готовую питательную среду разлить в пробирки на 1/3 объема, закрыть ватными пробками, расставить пробирки в металлические штативы.

9. Штативы с пробирками упаковать в целлофан (чтобы в автоклаве не открылись пробки), обвязать шпагатом.

10. Поместить штативы с пробирками в автоклав и проавтоклавировать 20 мин при давлении в 1 Атм.

### **1.5. Условия культивирования**

Влияние температуры, освещения, размера и формы сосуда для культивирования, на рост и развитие культур изучено недостаточно.

Оптимум освещенности для большинства видов составляет 2000- – 3000 лк. На первых этапах микроразмножения освещенность колеблется от 1000 до

3000 лк. На более поздних стадиях морфогенеза развитие регенерантов активизируется под действием более интенсивного освещения – 5000-10 000 лк, в результате чего облегчается адаптация растений к условиям *in vivo*. Высокая интенсивность света может вызывать хлорозы и задерживать развитие, но при переносе в почву эти растения растут лучше и энергичнее.

Спектральный состав также играет немаловажную роль. Некоторые исследователи указывают на синий свет как основной компонент морфогенеза. Красный свет стимулирует образование почек у табака, у салата – образование побегов, у березы – укоренение. В некоторых работах показано, что синий свет усиливает закладку вегетативных почек у побегов табака в условиях *in vitro*, а красный стимулирует развитие цветочных почек. Однако при добавлении цитокининов и ауксинов в различной концентрации соотношение процессов дифференциации цветочных и вегетативных почек меняется, в некоторых случаях наблюдается даже противоположный эффект.

При изучении влияния длины дня на рост и развитие клеточных культур установлено, что наиболее подходящий фотопериод для большинства видов растений в стерильной культуре составляет 16/8 часов.

Температура культивирования обычно варьирует в интервале 22-26°C днем и 18- 22°C ночью.

Обычно культуры выращивают в стеклянных пробирках или колбах с различными типами крышек (ватные пробки, алюминиевая фольга или металлические колпачки). Эмпирическим путем выявлено, что для микроразмножения предпочтительнее использовать конические колбы объемом 100-200 мл, закрытые фольговыми колпачками и герметизированные Parafilm'ом.

## **2. МЕТОДЫ И ЭТАПЫ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ *IN VITRO***

К настоящему времени термин "культура тканей растений" превратился в чрезвычайно широкое понятие, описывающее все многообразие работ с изолированными клетками, тканями и органами, а также с растениями – регенерантами в стерильных условиях, поэтому при использовании того или иного термина необходимо уточнять его значение.

Методы, которые можно использовать для микроразмножения растений в условиях *in vitro*, представлены на рис. 5.

Следует отметить, что единой общепринятой классификации методов микроразмножения, позволяющих клонировать исходный экземпляр, на данный момент не разработано. Существуют различные классификации, например, по способу культивирования, типу экспланта, морфогенетическому пути развития новых индивидуумов.

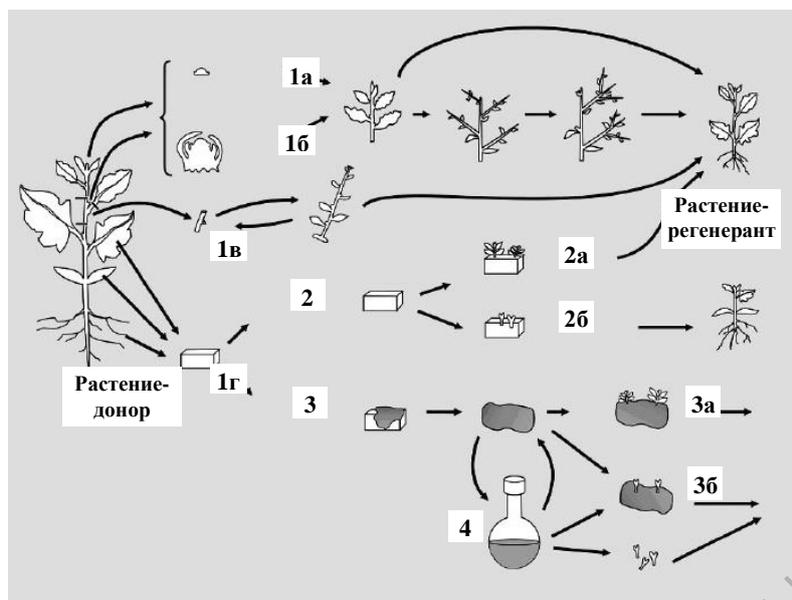


Рис. 5. Методы микроразмножения по George *et al.*, 2008 (пояснения в тексте)

Для культивирования *in vitro* можно использовать различные **первичные экспланты**, например: меристемы (1а), верхушки (1б) или узловыи сегменты побегов (1в), а также практически любые дифференцированные ткани исходного растения – донора (1г).

Образование новых растений при культивировании *in vitro* может происходить принципиально различными **морфогенетическими путями**:

- путем органогенеза – формированием вегетативных почек (однополюсных структур, физически связанных с тканью, из которой происходят) с последующей индукцией корней (2а, 3а);
- путем соматического эмбриодогенеза – формирования зародышеподобных двухполюсных структур, физически не прикрепленных к ткани, из которой они происходят (2б, 3б).

Формирование эмбриоидов или побегов можно индуцировать как непосредственно в тканях экспланта (2), так и в предварительно полученной каллусной ткани (3) или клеточной суспензии (4).

Регенерировать полноценное растение в культуре *in vitro* можно, используя несколько методов культивирования, однако, как правило, лишь один оказывается наиболее эффективным. Каждый из вышеперечисленных методов имеет свои достоинства и недостатки и должен использоваться с учетом стоящих перед исследователем задач. Краткая характеристика методов, применяемых для микроразмножения растений, их возможности и ограничения, представлены в Приложении (табл. 3).

Исходя из известных литературных данных, можно выделить следующие методы микроразмножения:

**1. Активация роста и развития уже существующих в растении (пресформированных) апикальных или пазушных меристем при культивировании почек и сегментов побегов** – один из основных методов микроразмножения. Он основан на снятии апикального доминирования,

которое можно достичь двумя способами:

а) удалением верхушечной меристемы стебля и последующим микрочеренкованием побега *in vitro* и культивированием узловых сегментов на безгормональной среде;

б) добавлением в питательную среду веществ цитокининового типа действия, индуцирующих развитие многочисленных пазушных побегов.

Полученные таким образом побеги отделяют от первичного экспланта и вновь культивируют на свежеприготовленной питательной среде либо аналогичного состава (для массового получения новых побегов), либо на среде с добавлением ауксинов, индуцирующих образование корней. Корнесобственные регенеранты с хорошо развитой корневой системой переносят в почвенный субстрат и создают условия, способствующие адаптации растений к нестерильным условиям.

**2. Индукция образования адвентивных (придаточных) почек непосредственно тканями экспланта.** Данный метод основан на способности растений регенерировать целые растения из отдельных частей (изолированного зародыша, листа, стебля, семядолей, чешуек и донца луковиц, сегментов корней и зачатков соцветий). Этот процесс осуществляется на питательных средах, содержащих одновременно цитокинины и ауксины в соотношении 10:1 или 100:1. Таким методом были размножены многие хозяйственно-ценные и декоративные травянистые растения, а также ряд древесных растений.

**3. Индукция каллуса с последующей дифференциацией почек или эмбриоидов,** при этом в качестве эксплантов для образования каллуса могут быть использованы ткани различных органов растений. Данный метод мало используется для получения посадочного материала. Это связано с тем, что при культивировании каллусной ткани в клетках происходят структурные перестройки хромосом и накопление генных мутаций, что может приводить к изменению ploидности растений-регенерантов. Наряду с генетическими, отмечаются и морфологические изменения: низкорослость, неправильное жилкование листьев, образование укороченных междоузлий, пониженная устойчивость к болезням и вредителям. В то же время, некоторые недостатки этого метода в селекционной работе могут стать преимуществами, способствуя созданию новых форм и вариантов. Кроме того, в некоторых случаях он является единственно возможным способом размножения растений в культуре тканей. Через каллусную культуру были успешно размножены многие культурные злаки, капуста, сахарная свекла, подсолнечник.

Соматический эмбриоидогенез в культуре тканей осуществляется, как правило, в несколько этапов. Сначала происходит дедифференциация специализированных клеток первичного экспланта под влиянием ауксинов, добавленных в питательную среду (например, 2,4-Д) и превращение их в эмбриональные. После снижения концентрации (или полного исключения) ауксинов из питательной среды из эмбриональных клеток формируются эмбриоиды. Соматические зародыши представляют собой полностью

сформированные зародыши, путем последующего капсулирования которых можно получить искусственные семена.

4. **Получение эмбриодогенных клеточных суспензий с последующей регенерацией растений из эмбриодов** чрезвычайно трудоемкий и экономически затратный метод, воспроизводим для немногих видов, мало используется в практических целях для массового получения посадочного материала.

**Этапы микроразмножения.** Процесс микроразмножения в культуре *in vitro*, как правило, включает следующие этапы:

1. отбор эксплантов, их стерилизация, подбор и оптимизация состава питательной среды, обеспечивающей наилучший рост и развитие эксплантов;
2. собственно микроразмножение – мультипликация (увеличение количества) побегов на среде для размножения;
3. укоренение микропобегов в стерильных условиях;
4. перенос растений-регенерантов в условия *in vivo* (рис.6).

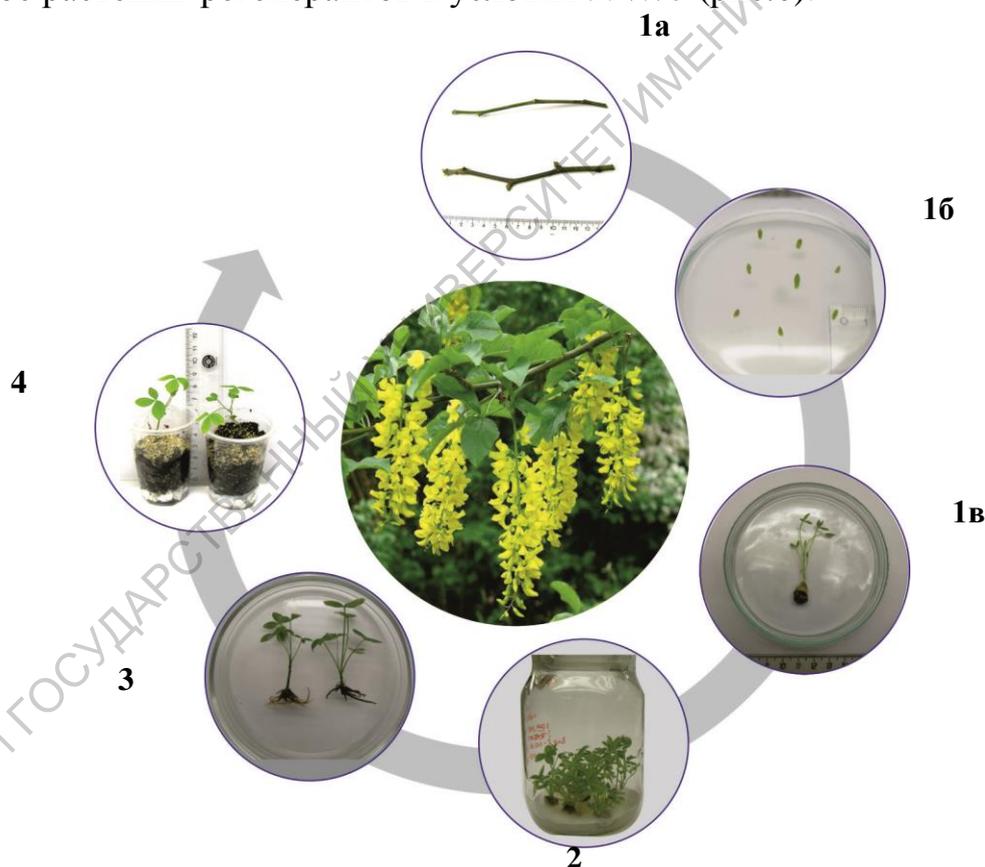


Рис. 6. Этапы клонального микроразмножения бобовника анагировидного

1. Инициация стерильной культуры:
  - а. однолетние побеги как источник первичных эксплантов (латеральные почки),
  - б. стерилизация, изоляция и помещение на питательную среду (день 0),
  - в. первичный побег, развившийся через 30 дней культивирования
2. Собственно микроразмножение – мультипликация (увеличение количества) побегов на среде для размножения;
3. Укоренение микропобегов в условиях *in vitro*;
4. Растения-регенеранты, высаженные в почвенный субстрат *in vivo*.

Успешность клонального микроразмножения определяется многими факторами: генотипом исходного растения-донора, составом питательной среды (минеральные соли, тип, концентрация и соотношение фитогормонов, тип и концентрация используемого углевода), типом первичного экспланта, его физиологическим состоянием, а также условиями культивирования.

### 3. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ IN VITRO

#### 3.1. Массовое размножение растений

Одним из направлений практического использования биотехнологических методов является разработка и внедрение технологий клонального микроразмножения, которые имеют ряд преимуществ перед существующими традиционными способами размножения:

- высокий коэффициент размножения ( $10^5$  -  $10^6$  - для травянистых, цветочных растений,  $10^4$ - $10^5$  - для кустарниковых древесных растений и  $10^4$  – для хвойных);
- получение генетически однородного посадочного материала;
- ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития;
- размножение растений, трудно размножаемых традиционными способами;
- возможность проведения работ в течение всего года.

Впервые данный метод был применен Ж. Морелем в конце 50-х гг. XX в. для микроразмножения орхидей. Модификации этой методики в настоящее время широко используются в коммерческих целях для массового размножения декоративных, ягодных и овощных культур.

Для массового размножения деревьев и кустарников методы культур *in vitro* стали активно привлекать, начиная с 70-х гг. XX в. Применение данных методов для древесных растений оказалось менее успешным по сравнению с травянистыми видами. Тем не менее, к настоящему времени разработаны технологии *in vitro*, которые являются достойной альтернативой традиционным способам размножения для многих хозяйственно-ценных плодовых, лесных и декоративных видов (ели, лиственницы, эвкалипты, яблони, сливы, вишни, сирени, березы, клены и др.).

Травянистые и древесные растения значительно различаются между собой уровнем тотипотентности клеток и регенерационным потенциалом. Это вызывает необходимость дифференцированного подхода к применению и совершенствованию технологий клонального микроразмножения.

При оптимизации технологий массового производства растений важно обеспечить их экономическую эффективность за счет снижения затрат на химические реактивы, удешевления питательных сред и повышения адаптационной способности пробирочных растений к условиям *in vivo*. Так, использование клонального микроразмножения для производства рассады

перспективных сортов земляники, повысило экономическую рентабельность производства в 2 раза.

### 3.2. Оздоровление посадочного материала от вирусов

Многие экономически важные растения подвержены заражению системными вирусами, бактериями и грибами. Кроме того, древесные растения накапливают патогенную микрофлору, ассоциированную с внутренними тканями, на протяжении своего жизненного цикла. Для удаления вирусов используют метод, известный как культура верхушечных меристем. Согласно этому методу для инициации стерильной культуры в качестве экспланта используют очень маленький (0.3–0.5 мм) участок апекса побега (меристематический купол и один-два листовых примordia).

В основе метода лежит предположение, что в молодых, быстро растущих недифференцированных тканях концентрация вирусов снижена вплоть до полной элиминации. По-видимому, вирусы не могут проникать в стеблевой апекс с такой же легкостью, как в другие ткани. Возможно, в случае проникновения их репликация подавляется реакцией растения на травму отсечения верхушки, хотя не исключены и другие факторы.

В целом, чем меньше размеры культивируемой меристемной ткани, тем выше шансы регенерировать растения, свободные от вирусов, хотя при этом скорость роста и жизнеспособность культур понижены. Несмотря на то, что миниатюрные размеры эксплантов осложняют их приживаемость в стерильных условиях, культивирование апикальных меристем широко используется для получения посадочного материала, свободного от патогенов.

Повысить выход безвирусных растений можно, сочетая меристемную культуру с термо- или хемотерапией донорных растений *in vivo* или регенерантов *in vitro*.

**Термотерапия** – использование сухого горячего воздуха. Донорные растения помещают в специальные термокамеры, где температура ежедневно повышается на 2°C и в течение недели достигает 37°C. Продолжительность периода термотерапии у разных видов составляет 10-12 недель и более.

Для роз и луковичных проводят термотерапию растений-регенерантов в процессе их культивирования *in vitro*. Одним из важных условий термотерапии является поддержание оптимального режима условий культивирования: температура 37°C, освещенность 5000 лк, фотопериод 16/8. относительная влажность воздуха 90%. Термотерапия позволяет оздоровить от 50 до 90 % регенерантов.

Для проведения **хемотерапии** культивируемого материала в питательную среду добавляют 1β-Д-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксимид (коммерческое название «Вирозол») в концентрации 20-50 мг/л. Выход безвирусных растений достигает 80-90%.

### 3.3. Сохранение биоразнообразия растений

Кроме массового производства посадочного материала, биотехнологические методы можно использовать в качестве инструмента для сохранения мирового генофонда растений, в том числе для размножения и сохранения исчезающих видов. Гарантией сохранения уникального генофонда культур, приспособленных к местным условиям обитания, является создание разнообразных коллекций генофонда. Они варьируют от относительно небольших рабочих коллекций, используемых селекционерами для их непосредственных нужд, до широкомасштабных законсервированных коллекций, содержащих целый спектр генотипов, включая те, чья ценность еще не определена. В таких коллекциях генотипы могут быть представлены как семенным материалом, так и культивируемыми в условиях *in vitro* тканями.

Однако для поддержания стабильно пролиферирующей культуры тканей требуются регулярные пересадки культивируемого материала на свежеприготовленную питательную среду, что является довольно трудоемким и дорогостоящим процессом. В настоящее время существуют два основных подхода к хранению культур *in vitro*: замедленный рост коллекции и криосохранение (или криоконсервация).

**Замедленный рост коллекции.** Для замедления роста большинства культур необходимы факторы, ограничивающие их рост. Наиболее часто используется снижение температуры культивирования. Поместив коллекции в условия низких температур (1-10°C в зависимости от холодостойкости вида растений), период между пассажами удается увеличить до 6-24 месяцев. Рост культур можно задержать добавлением к питательной среде ретардантов – соединений, способных замедлять рост (маннит, абсцизовая кислота и др.).

Более совершенным методом хранения генофонда является **криосохранение** (от греч. «криос» – мороз) – хранение растительного материала при очень низких температурах: при температуре сухого льда (-79°C), в морозильниках с ультранизкой температурой (-80°C и ниже), в парах жидкого азота (-140°C) или непосредственно в жидком азоте (-196°C).

Путем глубинного замораживания осуществляют хранение пыльцы, семян и культур меристематических тканей. Последнее особенно актуально для растений, которые размножаются только вегетативным путем (черенками, отводками, клубнями). Подвергая криоконсервированию меристемы, можно не только сохранить данный генотип, но и получить впоследствии путем клонального микроразмножения необходимое количество растений.

Криосохранение гарантирует стабильное сохранение генетических характеристик объектов в течение практически любого срока. Кроме того, хорошо отлаженное криосохранение менее трудоемко, чем поддержание и хранение полевых и культуральных коллекций с замедлением роста.

Технология криоконсервации включает следующие этапы: подготовка культуры (специальное предварительное культивирование); добавление криопротектора; программное замораживание; хранение в жидком азоте;

быстрое оттаивание; удаление криопротектора; рекультивирование и регенерация растений.

### 3.4. Методы культуры *in vitro* в генетике и селекции

Используемые в генетике и селекции методы культивирования изолированных клеток, тканей и органов *in vitro* условно можно разделить на две группы. Первая группа – это вспомогательные технологии, которые дополняют традиционные методы селекции. К ним можно отнести:

- оплодотворение *in vitro* (преодоление прогамной несовместимости); культивирование семязачатков и незрелых гибридных зародышей (преодоление постгамной несовместимости);
- получение гаплоидов путем культивирования пыльников и микроспор;
- клональное микроразмножение отдаленных гибридов.

Технологии *in vitro*, которые относятся ко второй группе, представляют собой самостоятельные методы селекции. Их используют для получения новых форм и сортов растений. Среди них:

- клеточная селекция с использованием каллусной ткани;
- соматическая гибридизация (слияние изолированных протопластов и получение неполовых гибридов);
- применение методов генной инженерии.

**Создание исходного материала для селекции в культуре соматических клеток.** При культивировании соматических клеток (особенно каллусных) растения-регенеранты нередко отличаются от исходного материала по ряду признаков. Такой полиморфизм обусловлен рядом причин.

Прежде всего, любой фрагмент растения (первичный эксплант) представляет собой мозаику различных тканей и начало каллусу могут дать клетки разных тканей. Полиморфизм культивируемых клеток также можно объяснить видовыми и возрастными особенностями, уровнем пloidности, влиянием состава питательной среды и условий культивирования, отсутствием коррелятивных связей, существовавших в целом растении. Кроме того, при длительном культивировании соматических клеток (особенно каллусных) в них могут возникать различные геномные, хромосомные и генные мутации. Это явление получило название «сомаклональная изменчивость». Ее генетическая природа и механизм возникновения пока еще мало изучены.

Увеличение разнообразия потомства за счет сомаклональной изменчивости может быть использовано для отбора новых уникальных генотипов и создания на их основе новых сортов культурных растений. На основе сомаклональной изменчивости были получены новые сорта овощных и декоративных культур, отличающихся высокой урожайностью и повышенной устойчивостью к заболеваниям.

**Создание исходного материала для селекции в культуре генеративных клеток и органов (пыльников и микроспор).** В условиях *in vitro* генеративные

клетки могут переключаться с гаметофитной на спорофитную программу развития. Индукция деления микроспор и образование эмбриоидов может происходить за счет **прямого и непрямого эмбриодогенеза**. В первом случае вегетативная клетка пыльцевого зерна делится подобно зиготе и дает начало эмбриоидам. Развивающиеся из эмбриоидов растения-регенеранты имеют гаплоидный набор хромосом. Данное явление получило название – андрогенез. При непрямом эмбриодогенезе из генеративных клеток образуется каллус, который дает начало эмбриоидам. Индукция андрогенеза зависит от возраста и физиологического состояния донорного растения, стадии развития пыльцы в момент введения пыльников в культуру, температурной предобработки донорных растений.

Культивирование *in vitro* микроспор и пыльников позволяет получать гаплоиды и гаплоидные каллусные ткани. На гаплоидном уровне легко выявлять и отбирать ценные рецессивные мутации. Из отобранных форм при последующей диплоидизации можно получить диплоидные гомозиготные растения для последующего использования в селекционных программах.

В настоящее время культура генеративных клеток и органов широко применяется при выведении новых сортов и форм хозяйственно ценных злаков. Однако для древесных и кустарниковых растений этот перспективный метод еще недостаточно разработан.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица 1

**Минеральный состав питательных сред по Мурасиге-Скугу (MS), Гамборга (B5),  
Андерсону, Кворин-Лепувра (QL), Драйвера и Каннуки Driver и Kuniyuki (DKW) и  
Woody Plant Medium (WPM)**

Компоненты	Концентрация в питательной среде, мг/л					
	MS	B5	Андерсон	QL	WPM	DCW
1	2	3	4	5	6	7
<b>Макросоли</b>						
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650,0	2500,0	400,0	400,0	400,0	1416,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	150,0	380,0	-	-	-
KNO <sub>3</sub>	1900,0	-	480,0	1800,0	-	-
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440,0	150,0	440,0	-	96,0	147,0
CaCl <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4 H <sub>2</sub> O	-	-	-	833,8	556,0	1811,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370,0	250,0	370,0	0,76 или	370,0	740,0
MgSO <sub>4</sub> ангидрат	-	-	-	175,8	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	134,0	-	-	-	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170,0	-	-	270,0	170,0	258,0
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	990,0	1560,0
<b>Хеллат железа</b>						
Na <sub>2</sub> ·EDTA	37,3	37,3	74,5	37,3	37,3	36,7
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	55,7	27,8	27,8	-
<b>Микросоли</b>						
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22,3	10,0	-	-	-	-
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	-	16,9	-	-	33,8
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,6	2,0	8,6	8,6	8,6	21,2
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	3,0	6,2	6,2	-	12,4
KJ	0,83	0,75	0,3	0,08	-	1,66
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25	0,25	-	0,5
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,25	0,05
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025	0,025	-	0,05

Фитогормоны, используемые при культивировании *in vitro*

Класс	Название	Сокращение	Воздействие	Примечание
Цитокинины	6-(4-окси-3-метил-2-бутенил) аминопурин	зеатин	индуцируют пролиферацию клеток и органогенез почек и побегов	зеатин термолабилен
	6-фурфурил аминопурин	кинетин		
	6-бензиламинопурин	6-БАП		
	N-фенил-N-1,2,3,-тидiazолил-5-мочевина	тидiazурон		
	2-изопентиладенин	2 iP		
	2-хлор-4-пиридил-N-фенилмочевина	4PU		
Ауксины	$\beta$ -индолилуксусная к-та	ИУК	активизируют метаболизм; стимулируют деление и растяжение клеток; индуцируют формирование проводящих пучков и корней	ИУК легко и быстро окисляется клетками. Высокие концентрации ауксинов стимулируют образование этилена.
	$\beta$ -индолилмасляная к-та	ИМК		
	$\alpha$ -нафтилуксусная к-та	НУК		
	2,4-дихлорфенилуксусная к-та	2,4-Д		
Гиббереллины	Гибберелловая к-та	ГК <sub>3</sub>	стимулируют деление и растяжение клеток меристематических зон, а также синтез ауксинов и цитокининов	термолабильны; чувствительность тканей к ГК усиливается на свету

## Методы микроразмножения растений

Цель использования	Объект размножения	Используемый эксплант	Метод размножения
Клональное микроразмножение	1. Ценные генотипы (когда количество исходного материала ограничено);  2. Гибридные формы, «расщепляющиеся» при обычном семенном размножении;  3. Виды, размножение которых традиционными методами малоэффективно	Побеги (почки, апикальные меристемы, стеблевые узлы);  листья;  семена (зародыши и сегменты проростков)	Активация апикальных и пазушных меристем. Ограничивает применение данного метода длительность - самый протяженный по времени
			Индукция почек или эмбриоидов непосредственно из клеток дифференцированных вегетативных органов. Используется преимущественно для травянистых растений
			Индукция каллуса с последующей дифференциацией почек или эмбриоидов. При использовании данного метода высока вероятность получения соматоклональных вариантов
			Получение эмбриоидогенных клеточных суспензий с последующей регенерацией растений из эмбриоидов. Метод чрезвычайно трудоемкий и экономически затратный, воспроизводим для немногих видов
Освобождение от вирусов и патогенов	Виды, успешно размножаемые традиционными методами, но подверженные вирусным заболеваниям	Апикальные меристемы почек и/или побегов	Активация апикальных меристем. Минимальные размеры эксплантов осложняют приживаемость в стерильной культуре

**Рекомендации по модификации состава питательной среды MS  
на разных этапах микроразмножения древесных растений**

Этап микроразмножения	Факторы питательной среды		
	Минеральные соли	Фитогормоны, мг/л	Органические добавки
Инициация	0,5-1,5 MS*	ЦК* в небольших концентрациях (0,05-0,5 БАП) или ЦК + А* (0,5 БАП + 0,1 ИМК)	сахароза: 1-5 % агар: 0,7- 0,8%
Размножение	1) сохраняют на уровне среды для инициации; 2) при потемнении и/или витрификации тканей экспланта концентрацию солей уменьшают в 1,5-2 раза	концентрацию ЦК увеличивают в несколько раз до появления аномальных побегов; или одновременно с увеличением ЦК* дополнительно вводят А* (1/2-1/10 от количества ЦК)	концентрацию сахарозы и агара обычно сохраняют на уровне среды для инициации
Укоренение	1) сохраняют на уровне среды для размножения; 2) концентрацию солей уменьшают, в 2-3 раза	1) снижают или исключают ЦК*; 2) вводят ауксины в небольших концентрациях; 3) полностью исключают гормоны из среды	концентрацию сахарозы снижают; концентрацию агара увеличивают до 1,1%

Примечание: MS\* - стандартная концентрация минеральных солей по прописи среды Мурасиге - Скуга, ЦК\* - цитокинины, А\* - ауксины.

## РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Джонс П. Размножение деревьев *in vitro* с помощью культуры побегов// Биотехнология сельскохозяйственных растений. – М. 1987. – С.135–152.
2. Зайцев Г.А. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. – М. «Наука», 1984. – 424 с.
3. Лобанова Л.П. Методы культивирования тканей и органов растений *in vitro*: учеб.-метод. пособие для студ. и асп. биол. фак. – Саратов: изд-во Саратов. ун-та, 2004. – 32 с.
4. Морозова Т.Т. Оздоровление, размножение и хранение земляники и малины в культуре *in vitro*. – СПб, 1999. – 24 с.
5. Муратова С.А., Шорников Д.Г., Янковская М.Б. Размножение садовых культур *in vitro* (методические рекомендации). – Мичуринск-наукоград, 2008. – 69 с.
6. Тимофеева С.Н., Эльконин Л.А., Тырнов В.С. Принципы клонального размножения древесных растений: учеб.- метод. пособие для студ. и асп. биол. фак. – Саратов: изд-во Саратов. ун-та, 2011. – 32 с.
7. Тиссера Б. Эмбриогенез, органогенез и регенерация растений// Биотехнология растений: культура клеток. М. 1989. С.97–127.
8. Anderson W. Tissue culture propagation of red and black raspberries *Rubus idaeus* and *R. occidentalis* // Acta Hort. – 1980. – V. 112. – P. 13–20.
9. Driver J., Kuniyuki A. *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock // HortScience. 1984. V. 19. P. 507–509.
10. George E. et al.(eds). Micropropagation: uses and methods // Plant propagation by Tissue Culture 3<sup>rd</sup> Edition, Springer. 2008. P. 29-64.
11. Lloyd G., McCown B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture// Intl. Plant Prop. Soc. Comb. Proc. 1980. V. 30. P. 421–427.
12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures// *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473–497.
13. Quoirin M., Lepoivre P. Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* sp.// Acta Hort. 1977. V. 78. 4. P. 437–442.
14. Timofeeva SN, Elkonin LA, Tyrnov VS Micropropagation of *Laburnum anagyroides* Medic. through axillary shoot regeneration // *In Vitro Cell.Dev.Biol.* –Plant, 2014, v.50 , pp. 561-567.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>1. Организация и техника лабораторной работы</b> .....	5
1.1. Устройство биотехнологической лаборатории .....	8
1.2. Посуда, инструменты, расходные материалы.....	8
1.3. Создание и поддержание стерильных условий.....	9
1.3.1. Работа в боксе.....	9
1.3.2. Стерилизация растительного материала.....	11
1.3.3. Дезинфекция культивируемого материала.....	13
1.4. Искусственная питательная среда.....	15
1.4.1. Состав питательной среды; минеральные соли.....	16
1.4.2. Состав питательной среды; органические добавки.....	17
1.4.3. Состав питательной среды; фитогормоны.....	17
1.4.4. Приготовление питательной среды.....	19
1.5. Условия культивирования.....	22
<b>2. Методы и этапы микроразмножения <i>in vitro</i></b> .....	23
<b>3. Использование биотехнологических методов <i>in vitro</i></b> .....	27
3.1. Массовое размножение растений.....	27
3.2. Оздоровление посадочного материала от вирусов.....	28
3.3. Сохранение биоразнообразия растений.....	29
3.4. Методы культуры <i>in vitro</i> растений в генетике и селекции.....	30
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ</b> .....	32
<b>РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА</b> .....	36

*Учебно-методическое издание*

**Тимофеева С.Н., Смолькина Ю.В., Апанасова Н.В.,  
Юдакова О.И.**

**ТЕХНОЛОГИИ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ *IN VITRO***

---

Подписано к печати  
Формат. Объем п.л.  
Тираж экз.  
Заказ N. Печать офсетная.

---