

**МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО СПЕЦИАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН**

**НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ УЗБЕКИСТАНА ИМЕНИ
МИРЗО УЛУГБЕКА**

БИОЛОГО-ПОЧВЕННЫЙ ФАКУЛЬТЕТ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ И ЦИТОЭМБРИОЛОГИИ

Калиниченко Зинаида Васильевна

**ПОБЕГООБРАЗОВАНИЕ ЛИСТОВОЙ
ПЛАСТИНЫ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА
Павловниевые (*Paulowniaceae*)**

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Ташкент 2014

План:

Введение

- ✓ актуальность
- ✓ проблематика
- ✓ цели

1.литературный обзор

- ✓ систематика
- ✓ ботаническое описание

2. основная часть

- ✓ Серилизация растений
- ✓ Приготовление питательных сред
- ✓ Метод тканевых культур
- ✓ Метод микроклонального размножения
- ✓ Метод индукции органогенеза из каллусной ткани
- ✓ Получение побега из листа

4. Выводы

5.Список используемой литературы

Введение

Суть данной работы заключается в получении побега *in vitro* из стерильной листовой пластины растения семейства Павловниевые (*Paulowniaceae*) с помощью воздействия на нее различных комбинаций цитокининов и ауксинов.

Материалом данной работы служит стерильная листовая пластинка растений семейства Павловниевые (*Paulowniaceae*) различных видов – Шан Тонг, , Элонгата, Гибрид (холодостойкий гибрид *Paulownia elongata* и *Paulownia tomentosa*).

Целью данной работы служит получение побега из листовой пластины, как альтернативный способ размножения данного растения *in vitro*. Также эта работа интересна тем что, стерильная листовая пластина является отходным материалом при микроклональном размножении растений семейства Павловниевые (*Paulowniaceae*), и может стать источником материала для каллусообразования с последующим преобразованием каллусных клеток в клетки эмбриоида для получения искусственных семян данного растения.

Павлония (*Paulownia*), или **Адамово дерево**— род растений семейства Павлониевые (*Paulowniaceae*) (ранее этот род иногда относили к семейству Бигнониевые и Норичниковые).

Листопадное дерево 15-20 м высотой, с крупной раскидистой, округлой или яйцевидной кроной; крупными, широкими листьями до 20 см длиной (у сильно растущих даже до 50 см), сердцевидной или яйцевидной формы, сверху пушистыми, снизу — войлочными, на длинных черешках.

Распускаются листья поздно и поздно опадают. Крупные, до 6 см в диаметре, душистые цветки собраны в конечные, метельчатые соцветия до 30 см длиной. Бутоны закладываются в конце лета, перезимовывают и распускаются весной будущего года, до или во время разворачивания листьев. Корневая система поверхностная, с длинными корнями, без ярко выраженного центрального корня.

Плоды — широкояйцевидные коробочки с многочисленными крылатыми семенами сохраняются на дереве в течение всей зимы. Одно дерево способно ежегодно приносить около 20 миллионов семян.



Рис.1 Плод растения семейства Павлониевые (*Paulowniaceae*)

К почве неприхотлива, растёт на любых, даже на сухих почвах, содержащих до 2% извести, но наилучшего развития достигает на глубокой умеренно

влажной, дренированной, достаточно плодородной глинистой почве. Не любит засуху и переувлажнение. Светолюбива. Предпочитает открытые, хорошо освещённые участки. Устойчива к перепаду температур. Довольно морозостойка, выдерживает непродолжительное понижение температуры до -28°C , при этом бутоны у неё вымерзают. В молодом возрасте чувствительна к морозам.

В пору плодоношения вступает в 4-5 летнем возрасте. Довольно морозостойка, выдерживает понижение температуры до -28°C , неприхотлива. Размножается обычно корневыми отпрысками и семенами, теряющими всхожесть через полгода. Можно размножать корневыми отпрысками и зелеными черенками.

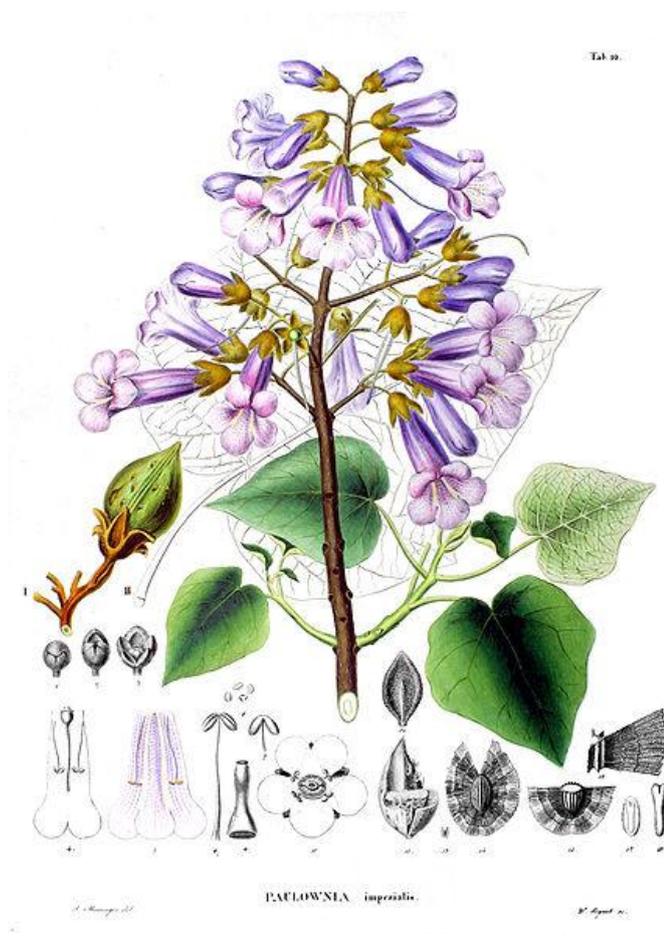


Рис 2 Общий вид растений семейства Павловниевые (*Paulowniaceae*)



Рис 3 Цветки растения *Paulownia catalpifolia*

Исторически настоящее название вида - *Равловния*, но со временем оно было изменено на *Paulownia*. Назван так в честь королевы Анны Павловны дочери Павла I Петровича. В Китае павловнию называют "драконовым деревом", а в Японии - "кири".

Павловния (*Paulownia*) это единственный род быстрорастущих деревьев из сем. *Paulowniaceae*.

Род *Paulownia* содержит несколько видов у которых имеются сходные качества и поэтому их называют собирательным названием павловния.

Виды павловнии:

Paulownia australis

Paulownia catalpifolia

Paulownia coreana

Paulownia duclouxii

Paulownia elongata

Paulownia fargesii
Paulownia fortunei
Paulownia glabrata
Paulownia grandifolia
Paulownia imperialis
Paulownia kawakamii
Paulownia lilacina
Paulownia longifolia
Paulownia meridionalis
Paulownia mikado
Paulownia recurva
Paulownia rehderiana
Paulownia shensiensis
Paulownia silvestrii
Paulownia taiwaniana
Paulownia thyrsoidea
Paulownia tomentosa
Paulownia viscosa

Все павловнии быстрорастущие деревья. По этой причине некоторые виды как *Paulownia tomentosa*, *Paulownia elongata*, *Paulownia fortunei* и др. используются для производства древесины, биомассы, этанола, фуража, бумаги и других продуктов.

Кроме промышленного выращивания с целью добычи древесины, павловнию выращивают и как медоносное дерево. У павловнии много цветков богатые нектаром, а мед полученный из них превосходного качества.

Обильное цветение, быстрый рост, большой размер (диаметр около 70 см) листьев, красивая крона и непретензиозность павловнии делают ее исключительно подходящей для парков и скверов. Листья павловнии огромного размера действуют как пылеулавливатели, а ускоренный

метаболизм, сопутствующий быстрый рост делают из нее фабрику кислорода.

Сравнительная характеристика по скорости роста первых 7 видов быстрорастущих деревьев на планете.

Из таблицы 1 видно, что у видов из рода Павловния (*Paulownia* spp.) самый быстрый рост, несравнимый ни с каким другим из древесных видов.

Таб.1 Сравнительная характеристика по скорости роста первых 7 видов быстрорастущих деревьев.

Вид	Годовой прирост	Высота 3-х летнего дерева	Максимальная высота взрослого дерева
Павловния, Императорское дерево, Кири, (<i>Paulownia</i> spp.)	3 – 5 м	10,5 – 15,5 м	15 – 20 м
Ива гибридная (<i>Salix</i> spp. hybrid)	1,5 – 4 м	7,5 – 12 м	15 – 25 м
Тополь черный (<i>Populus nigra</i>)	2,5 – 3,5 м	9 – 12 м	20 – 25 м
Тополь дельтовидный (<i>Populus deltoides</i>)	2,5 – 3,5 м	9 – 12 м	20 – 30 м
Дуб техасский красный (<i>Quercus texana</i> , <i>Quercus nuttalli</i>)	2 – 2,5 м	7,5 – 9 м	15 – 20 м
Эвкалипт красный (<i>Eucalyptus polyanthemos</i>)	2 – 2,5 м	6 – 9 м	10 – 15 м

Плакучая ива (<i>Salix babylonica</i>)	1,5 - 2,5 м	4,5 – 9 м	15 – 20 м
---	-------------	-----------	-----------

**Информация по данным исследований сделанных на территории США*



Рис. 1 поперечный разрез дуба старше 40 лет(слева) и 5-летняя павлония(справа)

Из всех указанных видов, павлония самая не взыскательная к качествам почвы. Она легко адаптируется к разным видам почвы, только единственное и специфическое условие при этом является наличие высокой влажности в первых годах ее развития. Растение живет долго - от 70 до 100 лет, которое само по себе является исключением по сравнению с остальными быстрорастущими деревьями.

И опять из-за того что павлонии быстрорастущие деревья, виды из этого рода подходящие помощники в создании ветрозащитных поясов, восстановлении сожженных лесов и как протовозерозийные насаждения.

Биомасса из павлонии подходящая, как для силосования (соответственно для откормки животных), так и для множества других целей, между которыми и ее использование в качестве сырья для альтернативных, возобновляемых источников энергии. Одно из самых перспективных

применений павловнии является биоэтанол, полученный из ее целлюлозы. Кроме многочисленных областей в которых он используется на данный момент, некоторые ученые видят в нем топливо будущего – легкое производство и применение без рисков для окружающей среды.

Решающее значение для всего процесса имеет поверхностная стерилизация растительного материала. Если она окажется неуспешной, питательная среда загрязняется и весь технологический процесс останавливается, так как растения погибают. Тип и концентрация дезинфицирующих растворов выбираются так, чтобы подавить любые грибковые или бактериальные инфекции, одновременно с этим повреждая растительную ткань. Обычно используются стерилизаторы кальций и гипохлорит натрия в концентрации 5-25% и продолжительностью стерилизации 5-30 минут с последующим неоднократным промыванием растительного материала стерильной, дистиллированной водой. Конечно, вполне возможно, использование других стерилизующих растворов.

В данном исследовании предварительная обработка и стерилизация проводится в следующем порядке:

- 1) Нарезка павловнии (отступ от субстрата - 2-3 см), срез всех листьев,
- 2) Промывка в проточной воде - 5 мин,
- 3) Замочка в мыле - 10 мин,
- 4) Промывка в проточной воде - 10-15 мин,
- 5) Замочка в фунгициде (Фундазол 2 г/л) - 15 мин (проводится перед введением в ламинарный бокс, непосредственно в потоке стерильного воздуха),
- 6) Замочка в 70% спирте (раствор со стерильной водой) + Tween 20 (2-3 капли на 100 мл) - 1 мин,
- 7) Промывка в стерильной воде - 5 мин,
- 8) Замочка в 10% H_2O_2 (раствор со стерильной водой) + Tween 20 (2-3 капли на 100 мл) – 10-15 мин),
- 9) Три промывки в стерильной воде по 5 минут,
- 10) Нарезка в чашках Петри (выделение узлов и срез всех отмерших тканей)

- 11) Нарезанные узлы и листья несколько секунд ополаскиваются 10% H_2O_2 (раствор со стерильной водой), а затем стерильной водой,
- 12) Высадка в среды

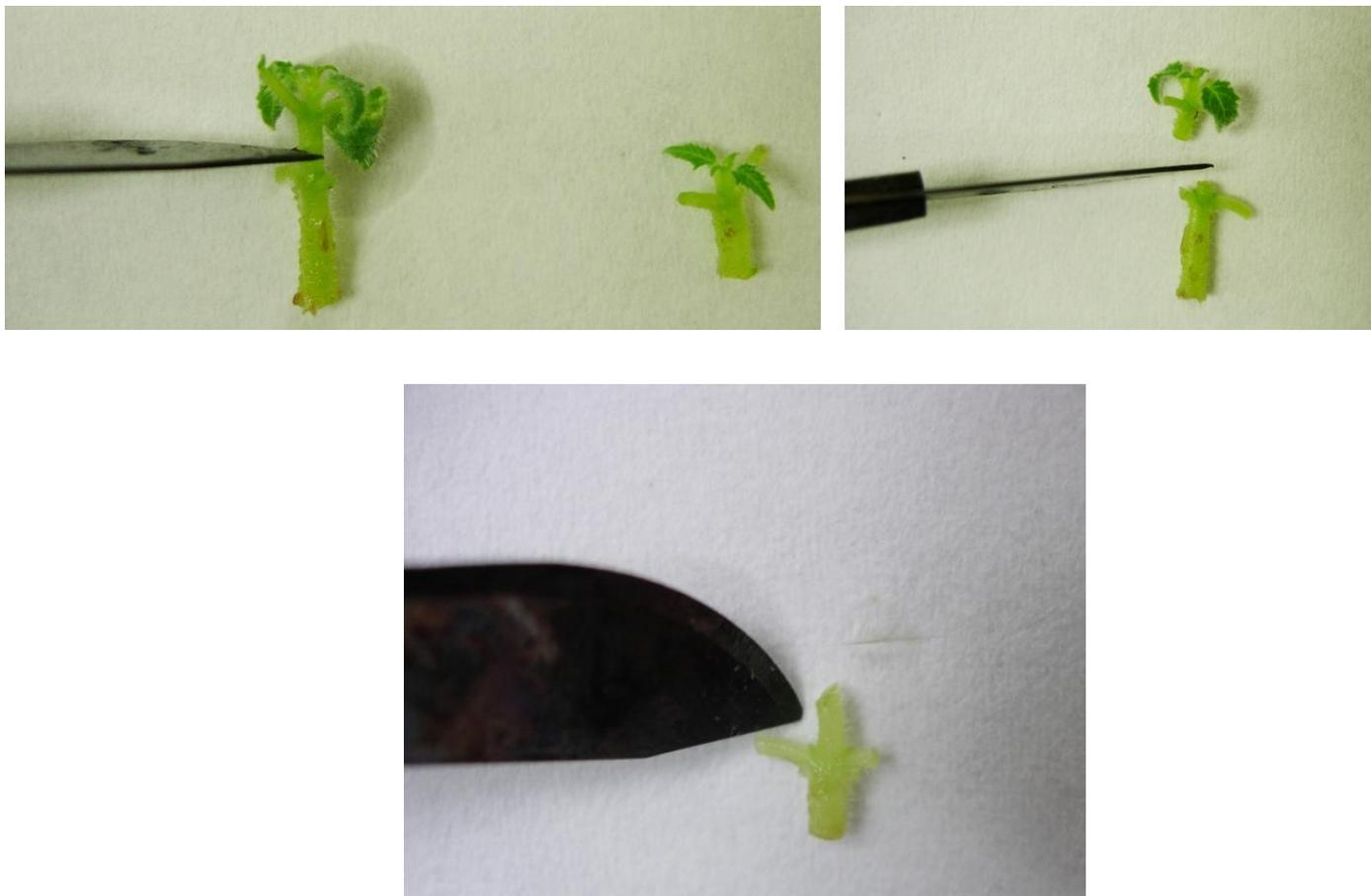


Рис 4 поэтапная обработка стебля при микрочеренковании.

Огромное значение для успешного микроразмножения имеет состав питательной среды в каждой из фаз развития растений. Питательные среды содержат по несколько компонентов в разных соотношениях (витамины, органические добавки, углеводы, макро- и микросоли). Разработаны несколько видов питательных сред на основе которых модифицируются и подготавливаются питательные среды в соответствии с конкретными потребностями растений. Состав питательных сред используемых в данной работе приведен в таблице 2. Среда готовится в бутылках емкостью

1л., рН раствора выдерживается в пределах 5,8-6,0. После чего среды автоклавированы при 1.1 атм в течении 30 мин.

Таблица 2 Общий состав питательных сред.

Агар	7 г/л
Среда MS	4,4 г/л
Сахар	30 г/л
Клафоран	500 мг/л

После автоклавирования среды остывают до 50-55°C, и затем происходит добавление необходимых антибиотиков и гормонов (содержание гормонов в конкретной среде приводится в таблице 3).

Таблица 3 Состав гормоносодержащих сред

Наименование среды	Состав	Содержание гормонов, мг/л			
		BAР	NAA	2,4-D	Kin
2b (контроль)	Агар – 7 г/л, Среда MS – 4,4 г/л, Сахар – 30 г/л, Клафоран – 500 мг/л	-	-	-	-
1		8	0,3		
4b				0,1	5
4c				0,5	2
4d				0,5	5
4e			2		0,1
4f			5		0,1
4g			2		0,5
4i			5	0,2	
4j			10	0,2	
4k			5	0,5	
4l			10	0,5	



Рис 5 недавно посаженные микрочеренки на среду 2b

Основными методами которые использовались в данной работе являются:

Метод культивирования тканевых культур

Метод микрклонального размножения растений

Метод индукции органогенеза из каллусной ткани

С начала 40-х годов прошлого века и до сих пор, метод тканевых культур непрерывно развивается и совершенствуется. Основные методы выращивания тканевых культур разработаны на основе относительно небольшого количества подходящих объектов такие как петуния, табак, морковь, люцерна, какао и некоторых дикорастущих растений. Конечно со временем количество растительных видов, включенные в экспериментальные *in vitro* разработки, значительно выросло. Известны и описаны методы культивирования в искусственной питательной среде больше 850 растительных видов. Опыты показали, что установленные как необходимые условия для одного вида, не всегда переносятся успешно на другой вид, так что для каждого вида, а чаще и для отдельного сорта необходимы модификации основной методологии.

Иными словами- эксперименты и практическое приложение в методе тканевых культур идут рука об руку и еще много открытий предстоит в этой области. Тканевые культуры используются как в фундаментальных общебиологических исследованиях, так и в селекции и растениеводстве.

Методом тканевых культур могут культивироваться *in vitro* практически все растительные части: меристема, растительные органы (цветочные почки, семепочки, завязи, семена, пыльца, корни, листья, части стебля), каллус (который можно индуцировать в любой части растения) и клетки. По отношению перспектив связанные с использованием тканевых культур при выращивании павловнии, достижения в растениеводстве и селекции являются особенно важными.

Для семенных растений характерно два способа размножения: семенной и вегетативный. Оба эти способа имеют как преимущества, так и недостатки. К недостаткам семенного размножения следует отнести, в первую очередь, генетическую пестроту получаемого посадочного материала и длительность ювенильного периода. При вегетативном размножении сохраняется генотип материнского растения и сокращается продолжительность ювенильного периода.

Достижения в области культуры клеток и тканей привели к созданию принципиально нового метода вегетативного размножения— клонального микроразмножения (получение в условиях *in vitro* ,неполовым путем растений, генетически идентичных исходному экземпляру).

В основе метода лежит уникальная способность растительной клетки реализовывать присущую ей тотипотентность, то есть под влиянием экзогенных воздействий давать начало целому растительному организму. Этот метод, несомненно, имеет ряд преимуществ перед существующими традиционными способами размножения:

- получение генетически однородного посадочного материала;
- освобождение растений от вирусов за счет использования меристемной культуры;

- высокий коэффициент размножения (10^6 -для травянистых, 10^5 - для кустарниковых, 10^4 – для хвойных);
- сокращение продолжительности селекционного процесса;
- ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития;
- размножение растений, трудно размножаемых традиционными способами;
- возможность круглогодичного размножения;
- размножение трудноразмножаемых растений;
- экономия площадей;
- отличная транспортабельность на дальние расстояния;
- длительное хранение (криосохранение).

Основные технологические элементы цикла размножения связаны с конкретными факторами:

- сортовые и видовые особенности размножаемого растения
- срок, в течении которого были взяты эксплантанты
- стерилизация исходного растительного материала
- состав питательной среды
- условия выращивания
- адаптация микрорастений к условиям окружающей среды

Крайне важно определить точный срок взятия эксплантантов в соответствии с физиологическими особенностями растительных видов. Для павлонии введение в стерильную культуру происходит во время активной вегетации растения.

Этапы клонального микроразмножения растений:

а) введение в культуру *in vitro*, стимулирование эксплантата к дальнейшему развитию;

- б) собственно размножение микроклонов;
- в) ризогенез вновь образованных *in vitro* побегов;
- г) акклиматизация микроклонов к нестерильным условиям.

У семейства **Павловниевые (*Paulowniaceae*)** в первой фазе процесса наблюдается усиленное нарастание вегетативной верхушки. На этом этапе в питательной среде кроме вышесказанных веществ, должны еще содержаться и подходящие регуляторы роста растений. Большое значение имеет их концентрация и пропорция в которой они применяются. Все же процент успешно адаптированных эксплантантов зависит кроме от баланса питательной среды, еще и от размера и срока их сбора. На этапе мультипликации (т.е. ускоренного размножения) важно завязать концентрацию конкретных регуляторов роста, чтобы вызвать пролиферацию дополнительных боковых почек. В правильных условиях эти почки приводят к появлению маленькой поросли (маленькие растеньица) которые образуют пучок. Количество порослей в пучке зависит от одной величины, которая имеет особое значение в данной материи - коэффициент размножения. Он является разным для разных видов. Существуют методы при помощи которых можно повысить коэффициент размножения. В общем, целью этого этапа является достижение необходимого количества растений позволяющее переход на следующий этап - укоренение.



Рис 6 Культивация микрочеренков *Paulownia ssp.*

Независимо от разработанных методов и многочисленных модификаций каждого этапа технологии микроразмножения, одним из самых трудных и ответственных моментов всего цикла остается адаптация растений выращенных методом *in vitro* к условиям окружающей среды. Независимо от того, что растения вынимают из культурального сосуда после формирования корней и надземной части необходимого размера и определенным количеством листьев, всегда существует определенный процент растений, которые вымирают. А те которые выживают и хорошо адаптируются, все еще не готовы к реализации. Необходимо доразвить растения в культивационных сооружениях - разные в разных сезонах. Там они достигают свои окончательные размеры, которые делают их пригодными к высадке, так что они ничем не отличаются от рассады полученной традиционным способом.

Точное познание каждого шага процесса производства растений методом *in vitro* позволяет спланировать каждый из описанных этапов.

Область применения микроразмножения разнообразна и имеет тенденцию к постоянному расширению. Это в первую очередь относится к размножению *in vitro* взрослых древесных пород, особенно хвойных, и использование техники *in vitro* для сохранения редких и исчезающих видов лекарственных растений. В настоящее время в этом направлении наметился положительный сдвиг.

Различают несколько способов микроклонального размножения растений

1. Активация развития уже существующих в растении меристем.
2. Индукция возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта.
3. Дифференциация из соматических клеток зародышеподобных структур.

4. Дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани.

1. Активация развития уже существующих в растении меристем.

Основывается на снятии апикального доминирования. Это достигается удалением верхушечной меристемы стебля и последующим микрочеренкованием побегов *in vitro* на безгормональной среде или добавлением в питательную среду веществ цитокининовой природы, индуцирующих развитие многочисленных пазушных побегов. Полученные побеги отделяют от первичного материнского экспланта и вновь самостоятельно культивируют на свежеприготовленной среде, стимулирующей пролиферацию пазушных меристем и возникновение побегов более высоких порядков. Этот метод широко используется для размножения культур промышленного цветоводства, плодово-ягодных культур, древесных растений.

2. Индукция адвентивных почек непосредственно тканями экспланта.

Она основана на способности восстановления недостающих органов у изолированных частей растения, а при благоприятных условиях – регенерации целых растений. Из любых органов и тканей растения можно добиться образования адвентивных почек (лист, стебель, сегменты корней), если их удастся получить свободными от инфекции. Этот процесс происходит на питательной среде, содержащей только цитокинины или эти фитогормоны в сочетании с ауксинами (10:1, 100:1).

3. Дифференциация из соматических клеток зародышеподобных структур.

Этот метод получил название – соматический эмбриогенез. Основное отличие образования зародышей *in vitro* от *in vivo* (в естественных условиях) заключается в том, что соматические зародыши развиваются асексуально вне зародышевого мешка и по виду напоминают биполярные структуры, у которых одновременно наблюдаются развитие апикальных меристем стебля и корня. Соматический эмбриогенез можно

непосредственно наблюдать в тканях первичного экспланта, а также в каллусной культуре. Но посадочный материал, полученный таким методом, будет генетически нестабилен по отношению к растению донору.

Дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани. Мало используется в целях получения посадочного материала *in vitro*. При периодическом пересаживании каллусной ткани на свежую питательную среду, изменяется ploидность культивируемых клеток, появляются структурные перестройки в хромосомах и возникают генные мутации, теряется морфогенетический потенциал культивируемых клеток. Эти изменения при длительном культивировании каллусных клеток накапливаются. Поэтому при клональном микроразмножении период неорганизованного роста должен быть сведен к минимуму.

Каллус - определенным образом организованная масса ткани, состоящая из дедифференцированных клеток.

Образование и рост каллусной ткани контролируется фитогормонами типа ауксинов и цитокининов. Под действием ауксинов происходит дедифференцировка, а под влиянием цитокининов - интенсивное деление, в результате которого образуется ткань. Спонтанное образование каллусной ткани в природе мы можем наблюдать на месте повреждения. Каллусные клетки затягивают рану, а впоследствии дифференцируются в утраченные ткани растения. Например, когда вы черенкуете розы или другие древесные растения, то на месте нижнего среза, погруженного в воду вырастает мозолеобразное образование - каллус, из которого затем формируются корни, происходит укоренение черенка. Очень часто каллус формируется на поврежденных корнеплодах моркови (особенно в месте среза листьев), на черешках кочанов капусты.

Каллусная культура – это неорганизованная пролиферирующая ткань, состоящая из недифференцированных клеток. В дальнейшем они специализируются как каллусные. Каллус может образовываться как на

изолированных участках ткани (эксплантах) *in vitro*, так и на растении при повреждении.

Каллусная ткань *in vitro* в основном бывает белого или желтоватого, реже светло-зелёного цвета (полная или зональная пигментация антоцианами). Тёмно-коричневая окраска возникает при старении каллусных клеток и вызвана накоплением в них фенолов. Каллусная ткань аморфна и не имеет конкретной анатомической структуры, но в зависимости от происхождения и условий выращивания она может быть различной консистенции:

1. Рыхлая, состоящая из сильно оводнённых клеток, легко распадающиеся на отдельные агрегаты.

2. Средней плотности, с хорошо выраженными меристематическими очагами.

3. Плотная, в которой дифференцируются элементы камбия и проводящей системы.

Обязательным условием дифференцировки растительной клетки и превращение её в каллусную является присутствие в питательной среде двух групп антагонистических гормонов: ауксинов и цитокининов. Ауксины вызывают процессы дифференцировки клетки, запуская механизмы активизации вторичных мессенджеров, способствующих растяжению клеточных стенок и дальнейшую пролиферацию, а цитокинины вызывают деление уже дифференцированных клеток. Для того чтобы дифференцированные клетки вновь приобрели способность к делению, необходим «возврат» к меристематическому состоянию (дедифференцировка). Размножение дифференцированных клеток приводит к анархическому, неорганизованному росту, в результате чего образуется каллусная ткань. Таким образом, превращение специализированной клетки в каллусную связано с индукцией митозов, способность к которому была потеряна в процессе дифференцировки.

Эффект, вызываемый действием одних и тех же фитогормонов, может быть различным в зависимости от физиологической характеристики ткани-мишени. Её компетентность определяется степенью дифференцировки клеток.

Переход клетки *in vitro* из дифференцированного состояния к дедифференцировке и активным клеточным делениям обусловлен изменением активности генов (эпигеномной изменчивостью). Активирование одних генов и репрессирование других приводит к изменению в белковом составе клеток. В каллусных клетках появляются специфические белки и одновременно исчезают или уменьшаются в количестве белки, характерные для фотосинтезирующих клеток листа. У двудольных растений процесс репрессии и дерепрессии генов, лежащий в основе дедифференцировки, происходит легче, чем у однодольных. При переходе дедифференцированной клетки к неорганизованному анархическому размножению, приводящему к образованию каллусной ткани, в клетках происходят биохимические и цитологические изменения. Дедифференцировка начинается с использования запасных веществ и разрушения специализированных клеточных органелл. Через 6—12 ч после индукции дедифференцировки клеточная оболочка разрыхляется и разбухает, увеличивается число свободных рибосом, возрастает число элементов аппарата Гольджи, увеличиваются размеры и число ядрышек. Все эти изменения предшествуют началу делений, которые начинаются через 48-72 часа.

Каллусная клетка повторяет онтогенез любой клетки и включает деление, растяжение и дифференцировку, старение и отмирание клетки. Ростовая кривая клеток S-образной формы (рис. 7), и включает себя 6 фаз:

- латентная (1) – клетки подготавливаются к делению,
- экспоненциальная (2) – наблюдается наибольшая митотическая активность и увеличивается масса каллусной культуры,
- линейная (3) – характеризуется постоянной скоростью роста,

- замедленного роста (4) – митотическая активность резко снижается,
- стационарная (5) – начинается деградация клеток, но еще она уравнивается возрастанием числа клеток за счет их деления,
- отмирания (6) – число и масса живых клеток уменьшаются.

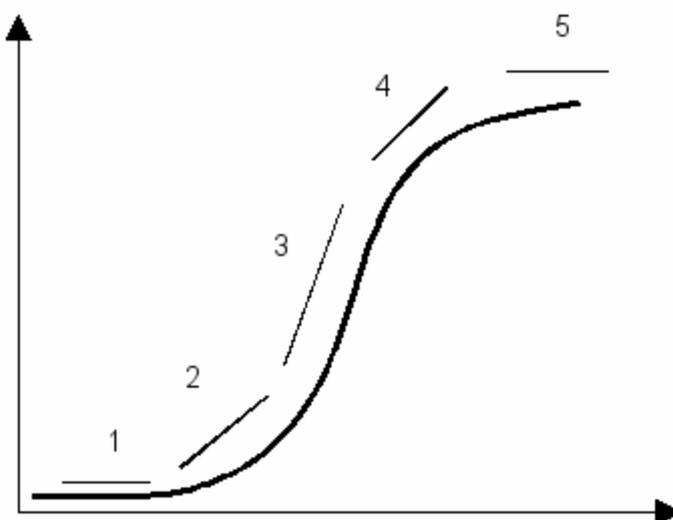


Рис. 7.Ростовая кривая каллусных клеток

Каллусную дифференцировку можно назвать вторичной, но её не следует путать с вторичной дифференцировкой клетки, лежащей в основе морфогенеза. Для того чтобы не произошло старения, утраты способности к делению и отмирание каллусных клеток, первичный каллус, возникший на эксплантах, через 4-6 недель переносят на свежую питательную среду – пассируют. При регулярном пассировании способность к делению может поддерживаться в течение нескольких лет.

Успех в применении культуры клеток и тканей в первую очередь зависит от оптимизации физиологических процессов, обеспечивающих нормальную пролиферацию, их дифференцировку и регенерацию из них взрослых особей. Наиболее сложной является регенерация растений из отдельных клеток. В первую очередь это касается злаковых растений. Поэтому важнейшее значение имеет выяснение механизма морфогенеза *in vitro*, регенерация и лежащих в их основы процессов.

Каллусные клетки *in vitro* сохраняют многие физиолого-биохимические черты, свойственные нормальным клеткам, входящим в состав растительного организма. Каллусные клетки сохраняют способность к синтезу вторичных метаболитов. Морозостойкость и способность к закаливанию присущи каллусным клеткам, полученным от морозостойких растений. Этим свойством не обладают каллусные ткани, полученные от тропических и субтропических культур. Таким образом, устойчивость к низким температурам сохраняется при переходе клетки к каллусному росту. Каллусным тканям свойственна и фотопериодическая реакция, что связано с сохранением активности фитохромов. Общим у каллусных и нормальных клеток растения является и еще ряд признаков, в частности, устойчивость к действию высоких температур, осмотически активных веществ, засолению.

Вместе с тем каллусные клетки обладают отдельными свойствами, отличающими их от нормальных. В них появляются специфические белки, и уменьшается количество белков, характерных для фотосинтезирующих клеток листа, или они совсем исчезают. Каллусные клетки отличаются большой генетической гетерогенностью и физиологической асинхронностью.

В результате выхода из-под контроля организма рост каллусных клеток происходит неорганизованно, асинхронно, и является неограниченным.

Клеточный цикл у каллусных клеток более длительный, чем у растений, произрастающих в открытом грунте. Особенностью каллусных клеток является гетерогенность по возрасту. В каллусной ткани одновременно присутствуют клетки молодые в G1-фазе, старые в G2- и S-фазах цикла клеточных делений.

Значительные отличия наблюдаются в энергетическом обмене каллусных клеток. Они потребляют меньше кислорода по сравнению с нормальными.

Митохондрии в каллусных клетках так же, как и в меристематических, являются слабо развитыми, в них мало крист, что не может не оказывать влияния на активность аэробного дыхания.

Наряду с изменением характера дыхания в каллусных клетках в направлении усиления бескислородного расщепления углеводов происходит также сдвиг в сторону пентозофосфатного пути, который является источником пентоз, необходимых для делящихся клеток.

Длительное время считали, что каллусные клетки генетически строго однородны. Однако клетки каллусной ткани обладают выраженной генетической гетерогенностью. Генетическая неоднородность каллусных клеток выражается, прежде всего, в различной ploидности, т.е. каллусные клетки отличаются по числу хромосом. Генетически стабильными *in vitro* являются меристематические ткани. В каллусных и суспензионных культурах встречаются клетки, имеющие диплоидный набор хромосом, свойственный исходному растению, полиплоидные клетки, содержащие 3, 4, 5 и более хромосомных наборов. Наряду с полиплоидией в культуре каллусных тканей можно нередко наблюдать анеуплоидию (возрастание или уменьшение хромосомного набора на несколько хромосом). Чем дольше культивировать каллусные клетки, тем больше они различаются по ploидности. В каллусных клетках табака через четыре года культивирования совсем не остается диплоидных клеток: все клетки становятся полиплоидными или анеуплоидными. Этот факт указывает на то, что изменение ploидности происходит под влиянием условий культивирования и, прежде всего входящих в состав питательной среды веществ. Однако можно интерпретировать его и иначе. Полиплоидные клетки имеют меньшую лаг-фазу и поэтому быстрее переходят к делениям, чем диплоидные. Вследствие этого они и получают преимущество в дальнейших пассажах. Скорее всего, влияние оказывают обе причины.

Кроме изменения ploидности, культивирование клеток и тканей растений *in vitro* вызывает появление в клетках хромосомных aberrаций. Последние сказываются на биологических особенностях культивируемых тканей, изменяя их внешний вид, обмен веществ, скорость роста. Наряду с видимыми под микроскопом хромосомными мутациями в культивируемых

клетках могут возникать изменения, не выявляемые микроскопически. Эти изменения могут затрагивать как незначительные участки хромосом, так и структуру генов. Генные мутации выявляются по изменению морфологии и физиолого-биохимических свойств клеток.

Каковы же причины генетической нестабильности культивируемых клеток? Таких причин несколько. Прежде всего – это генетическая неоднородность исходного материала (гетерогенность экспланта). У многих растений дифференцированные ткани характеризуются наличием клеток разной ploидности и лишь активно пролиферирующие в течение онтогенеза ткани, такие, как верхушечные меристемы, камбий и другие, остаются всегда диплоидными. Другой причиной может быть длительное пассирование тканевых и клеточных культур, приводящее к накоплению в них генетических изменений, в том числе к неравномерному изменению ploидности. Нарушение коррелятивных связей при изолировании участков тканей растений и помещении их на питательную среду также приводит к генетической нестабильности клеток. Подобные результаты могут быть связаны и с влиянием на генетический аппарат клетки входящих в состав питательных сред фитогормонов. В качестве гормонов в питательные среды для каллусообразования обязательно входят ауксины и цитокинины. О мутагенном действии этих веществ известно из целого ряда работ. Наиболее активным мутагенным препаратом является 2,4-Д (2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота – синтетический аналог индолилуксусной кислоты), входящий в состав большинства питательных сред. Цитокинины, в частности кинетин, способствуют полиплоидизации клеток. Не исключено, что возникновение генетических аббераций вызвано накоплением вторичных метаболитов, и в частности полифенолов.

Существует несколько путей, по которым может идти развитие клетки после ее дедифференцировки.

- **Первый путь** – это вторичная регенерация целого растения, возможна дифференцировка на уровне клеток, тканей, органов.

- **Второй путь** - это утрата клеткой способности к вторичной дифференцировке и регенерации растения, стойкая дедифференцировка, приобретение способности расти на среде без гормонов, т.е. превращение в опухолевую. Такими свойствами часто характеризуются клетки старых пересадочных культур. На рисунке изображены фазы клеточного цикла, и показано, в каких из них клетки могут выйти из митотического цикла, и перейти в дифференцированное состояние и соответственно вернуться в цикл при дедифференцировке и индукции их к делению. Обычно клетки переходят к специализации из фазы G1.

- **Третий путь** - это нормальный цикл развития каллусной клетки, заканчивающийся ее старением и отмиранием. В этом случае клетка претерпевает вторичную дифференцировку и прекращает делиться (стационарная фаза роста). Однако такая дифференцировка не ведет к морфогенезу, а закрепляет за ней свойства старой каллусной клетки. В культуре каллусных тканей морфогенезом называют возникновение организованных структур из неорганизованной массы клеток.

Существует два основных типа морфогенеза. В культуре тканей он может проявляться в виде **органогенеза** (образования монополярной структуры, т.е. отдельных органов); корневого, стеблевого, реже флорального (цветочного) или листового, в виде **соматического эмбриогенеза** (образования биполярных зародышеподобных структур из соматических клеток).

В случае органогенеза сначала регенерируют отдельные органы, а затем уже из них - целые растения, исключение составляет корневой органогенез. В результате соматического эмбриогенеза в отличие от органогенеза сразу образуется зародыш, имеющий как меристему корня, так и меристему верхушечной почки, из которого в дальнейшем развивается целое растение.

Согласно концепции тотипотентности, если мы получаем каллус из клеток лепестка цветка, или из клеток сердцевинной паренхимы стебля, или

из клеток любой ткани, то в принципе каждая такая клетка может регенерировать целое растение. Однако свойство тотипотентности не всегда реализуется, так как потенциальные возможности клеток разных типов проявляются неодинаково. В некоторых из них гены в сильной степени репрессированы, в связи с чем проявление тотипотентности становится ограниченным.

Клеточную основу морфогенеза составляет цитодифференцировка. Регенерация растения начинается с вторичной дифференцировки клеток. При этом дедифференцированные клетки вновь приобретают структуру и функции специализированных. Вторичная дифференцировка каллусных клеток не всегда заканчивается морфогенезом и регенерацией растения. Иногда она приводит только к образованию тканей (гистодифференцировка). Таким путем каллусная клетка может превращаться во флоэмные или ксилемные элементы. Другим примером вторичной дифференцировки может служить превращение дедифференцированной активно пролиферирующей клетки в старую неделящуюся каллусную клетку (стационарная фаза роста).

Из всех видов вторичной дифференцировки наибольший интерес представляет морфогенез, так как он позволяет получать целое растение из каллусной клетки. Как отмечалось выше, в основе дифференцировки и морфогенеза лежит последовательное включение различных генов, т.е. дифференцировка клеток определяется дифференциальной активностью генов. Изменение активности структурных генов может быть связано с их дерепрессией, репрессией или амплификацией. Большую роль в этом процессе играют фитогормоны.

Морфогенезом в культуре каллусных тканей можно управлять. На способность изолированных растительных клеток к морфогенезу оказывают влияние как внутренние, так и внешние факторы. К внутренним факторам относятся: видовая принадлежность исходного растения, орган, из которого взят эксплант, возраст экспланта, и даже его массы. В этом случае можно говорить об «эффекте минимальной массы», который сводится к тому, что

способность уже детерминированных клеток к дальнейшей дифференцировке зависит от наличия некоторой минимальной массы, необходимой для морфогенеза.

Любопытны работы по выявлению зависимости регенерации растений от скорости их развития. Раннеспелые сорта характеризуются более низким уровнем регенерации по сравнению с позднеспелыми культурами. Возможно, что выделенные для культивирования *in vitro* из более быстро развивающихся растений органы и ткани могут иметь более короткий период существования инициальных меристематических клеток, обеспечивающих морфологическую компетентность у потенциальных эксплантов.

К внешним факторам, прежде всего, относятся: состав питательной среды, температура, свет (интенсивность и длина фотопериода). Наиболее мощным индуктором морфогенеза, который принято называть стимулом или сигналом морфогенеза, является изменение соотношения между цитокининами и ауксинами, входящими в состав питательных сред.

Присутствие в среде одного ауксина определяет переход специализированной клетки из фазы G₀ митоза в S-фазу. Однако для завершения фазы синтеза ядерной ДНК, синтеза белков, стимулирующих переход клеток к митозу и цитокенезу, необходимо добавление к среде кинетина.

При преобладании цитокининов над ауксинами часто начинается стеблевой органогенез, а в случае преобладания ауксинов – корневой. Это легко объяснить антагонистичностью двух гормонов, их совместным аттрагирующим эффектом и процессом индукции/репрессии апикального доминирования.

Таким образом, различия в балансе экзогенных гормонов ауксинового и цитокининового рядов определяет, с одной стороны, возможность перехода клетки в культуре к дифференцировке и неорганизованной пролиферации, а

с другой стороны - индукцию вторичной дифференцировки того или иного типа морфогенеза.

Если органогенез можно индуцировать с помощью ауксинов или цитокининов, то соматический эмбриогенез фактически независим от экзогенных фитогормонов. Обычно эмбриогенные зоны возникают в каллусной ткани на той же питательной среде, которая использовалась для каллусообразования. Развитие соматических зародышей в каллусной ткани начинается тогда, когда устраняется дедифференцирующий фактор из питательной среды (2,4-Д или другие ауксины). Развивающийся зародыш не нуждается в экзогенных гормонах, так как сам обеспечивает себя ими.

Независимость соматического эмбриогенеза от гормонов является аргументом в пользу точки зрения, высказанной Хаберландтом, а позднее Стэвардом, что сам процесс изолирования клетки стимулирует реализацию ее тотипотентности, т.е. переход к морфогенезу. Таким образом, основными стимулами морфогенеза являются изменения соотношения гормонов в питательной среде, а также сам процесс изоляции растительной клетки от организма.

Дополнительными стимулами морфогенеза в культуре каллусных тканей является присутствие в питательной среде нитрата серебра, нитрата аммония, некоторых аминокислот (пролин, тирозин, иногда серии), полиаминов (путресцин и спермидин). В ряде случаев стимулируют процесс морфогенеза маннит и сорбит. Ионы NO_3^- оказывают влияние на развитие возникших в каллусной ткани организованных структур, а их индукцию стимулируют ионы NH_4^+ . Гиббереллиновая кислота стимулирует рост зачатков стебля, а абсцизовая ускоряет дифференцировку органов соматических зародышей. Интересно отметить, что некоторые из перечисленных веществ, например, нитрат серебра, продлевают регенерационную способность в старых пересадочных культурах. Под влиянием того или иного стимула морфогенеза каллусная клетка должна стать детерминированной, однако не все клетки, а лишь одна из 400—1000

становится на путь регенерации. Следовательно, для перехода к морфогенезу недостаточно индуктора (стимула), а необходимо, чтобы клетка была готова к ответу на него. Способность воспринимать стимулы морфогенеза называют компетентностью клетки. Исследователи пришли к выводу, что компетентность клеток - событие случайное и поэтому столь редкое. В связи с этим напрашивается вопрос о судьбе тех каллусных клеток, которые в силу некомпетентности не способны воспринять стимулы морфогенеза и детерминироваться. В пересадочной культуре эти клетки продолжают делиться и, скорее всего, становятся на путь перехода к гормоннезависимости. Однако не все каллусные ткани со временем завершают развитие возникновением гормоннезависимости.

Многие из них в силу генетических особенностей продолжают использовать экзогенные гормоны, но полностью утрачивают способность к регенерации. Такие ткани занимают промежуточное положение между «привычными» и свежими каллусными тканями. Морфогенез в каллусной ткани начинается с того, что под влиянием соответствующих условий детерминированная клетка обособляется от окружающих ее каллусных клеток, образуя утолщенную клеточную стенку. Клетка - инициаль при соматическом эмбриогенезе дает начало зиготе, а при органогенезе - меристематическому очагу. От недетерминированных каллусных клеток инициальная отличается более крупным ядром и меньшими размерами вакуолей. Ядро обычно занимает центральное положение. В инициальных клетках содержатся большие количества запасных веществ: крахмала, иногда — липидов. Некоторое время инициальные клетки находятся в лаг-фазе, что необходимо для их перестройки и подготовки к последующим быстрым делениям. Затем эти клетки делятся по типу дробления, образуя сферическую массу мелких изодиаметрических клеток. В случае органогенеза эту массу клеток называют меристематическим очагом, а в случае соматического эмбриогенеза - глобулярным проэмбрио. В дальнейшем в меристематическом очаге дифференцируются зачатки стебля, корня, листа или цветочной почки

и соответственно происходит стеблевой, корневой, листовой или флоральный органогенез. В глобулярном проэмбрио развивается биполярная эмбриоидная структура. Можно выделить несколько последовательных стадий формирования соматических эмбриоидов из каллусной клетки: **глобулярную, сердечка, торпедовидную, соматического зародыша.** Меристематические очаги или проэмбрио могут возникать на периферии каллусной ткани или быть погруженными в нее. Обычно не наблюдается определенной закономерности в их локализации.



Рис. 8 Стадии формирования соматических эмбриоидов

Сравнительный анализ половых и соматических зародышей позволяет говорить о параллелизме их развития, который проявляется в основных закономерностях морфогенеза (полярности, симметрии, клеточной и тканевой дифференциации, способности к пролиферации). И половые и соматические зародыши характеризуются полиморфизмом, переходными формами и аномалиями. Генезис и структура соматического зародыша таксоноспецифичны. Возможно, они определяются местом формирования инициальной клетки. С помощью сопоставления характеров формирования половых и соматических зародышей, была выделена новая категория вегетативного размножения растений – эмбриодогения.

При переходе каллусных клеток к морфогенезу происходит существенное изменение их метаболизма. Морфогенезу предшествует появление в клетках белков-антигенов. В работах Р.Г. Бутенко, Н.И.

Володарского и Н.А.Моисеевой показано, что морфогенез в культуре каллусных тканей табака характеризуется включением и исключением синтеза определенных белков-маркеров. В меристемах обнаружено два белка-антигена, которые являются маркерами этих клеток. Одновременно показано, что индуцированная детерминация клеток каллусной ткани сопряжена с появлением в ней антигена-маркера клеток меристемы стебля.

Белок, выделенный из эмбриогенных культур, можно рассматривать как конденционирующий фактор. При частых пересадках на свежую питательную среду, где гликопротеид накапливаться не может, эмбриогенез не идет. Если белок, появляющийся в клетках при переходе к соматическому эмбриогенезу, выделить и ввести в длинные (неэмбриогенные) каллусные клетки, у которых гены морфогенеза не работают или потеряны, то в них индуцируется переход к морфогенезу. Работы по поиску новых маркеров морфогенеза продолжаются. Клетки меристематических очагов и клетки, дающие начало эмбриоидным структурам, отличаются от каллусных интенсивным синтезом РНК и ДНК, что связано с особенностями их белкового обмена. Изменения в белковом обмене сходны с теми, которые протекают при дедифференцировке клетки, но итоги у них различны. Специфика реакции определяется не общим усилением синтеза макромолекул, что необходимо для усиленной пролиферации, а теми уникальными синтезами, которые идут на этом общем фоне и обуславливают появление белков регуляторного типа. Переход к морфогенезу в культуре каллусных тканей сопровождается значительными изменениями дыхательного метаболизма. В целом дыхание (по CO_2) усиливается, но изменяется его характер в направлении интенсификации пентозофосфатного пути. Возрастает активность дыхательных ферментов. Вслед за биохимической наступает структурная реорганизация клетки. Биохимическая дифференцировка клетки всегда предшествует структурной. В клетках, вступивших на путь морфогенеза, возрастает число рибосом, митохондрий, меняется их внутренняя структура. Процессы морфогенеза в каллусных

клетках протекают асинхронно и продолжительно. Одновременно в каллусной ткани могут иметься как полностью сформированные структуры, так и клетки, только что вступившие на этот путь. Повышенная синтетическая активность клеток меристематического очага и глобулярного проэмбрио делает их аттрагирующим центром, в который устремляются питательные вещества. Окружающие каллусные клетки при этом часто разрушаются и образующиеся эмбриониды легко выпадают из массы каллусных клеток. Каллусные клетки не связаны между собой плазмодесмами или последние сильно редуцированы. При появлении зародышеподобных структур или меристематических очагов между клетками снова восстанавливается связь с помощью плазмодесм. Все изменения, происходящие при морфогенезе и заканчивающиеся регенерацией из каллусной клетки растения, управляются (контролируются) специальными генами. В настоящее время одни ученые считают, что признак морфогенеза полигенен и контролируется несколькими хромосомами, другие пришли к заключению, что этот признак определяется двумя ядерными генами. Тот факт, что морфогенетическая активность каллусных клеток имеет генетическую природу, объясняет, почему не удается в ряде случаев получить регенерацию из каллусной ткани тех или иных генотипов. Регенерационную способность может увеличить скрещивание генотипов, морфогенетически активных *in vitro*.

В работах М.И.Соболевой и И.В.Логинова была сделана попытка определить зависимость морфогенной способности каллусов от различных факторов. По их мнению, тотипотентность и пролиферация тесно связаны единым молекулярным механизмом, выключение или нарушение которого приводит в культуре *in vitro* к формированию неморфогенного каллуса. Исследование комплексного показателя «размер-прирост биомассы» каллусов позволило заключить, что морфогенные каллусы увеличивают свою биомассу за счёт активной пролиферации, чем за счёт активного накопления сухого вещества. Увеличение биомассы и размера за счёт оводнения клеток в

сочетание с их растяжением также маловероятно, так как в этом случае морфогенный каллус приобретал бы рыхлую оводнённую консистенцию, а он имел плотную глобулярную структуру. Прирост биомассы неморфогенного каллуса, по их мнению, в большей степени зависит от роста растяжением в сочетании с оводнением клеток. В ряде работ были выявлены морфологические различия клеток морфогенных и неморфогенных каллусов. Например, поверхность проэмбриональных клеточных комплексов морфогенного каллуса покрыта сетью экстраклеточного матрикса (ЭКМ), тогда как на поверхности клеток неморфогенного каллуса ЭКМ не наблюдается. Поверхностная сеть экстраклеточного матрикса представляет собой фибриллярную белковую структуру. ЭКМ – это структурный маркер характерный для проэмбриональных клеточных комплексов морфогенных культур и проэмбрио. Таким образом, наличие ЭКМ коррелирует с морфогенной способностью каллусов.

Материалом для данного исследования служит стерильная листовая пластина месячного саженца растения Павловния различных видов, срезанная с частью черешка в условиях *in vitro*.

Узлы размером 5-10 мм, высаживаются по 5-15 штук на безгормональную среду (см. таб. 4) и выращиваются на культуральном стеллаже в течении месяца при температуре 25-27°C и периоде освещенности 16/8 (день/ночь). После этого они переносятся в ламинарный бокс, где подвергаются стерильной нарезке, во время которой и производится срез листовой пластины. Далее листовые пластины разделяются на 2-6 частей (в зависимости от размера листа), обязательно содержащих крупный проводящий сосуд и высаживаются на гормоносодержащую среду 1 (таб. 5). Выращивание проводится в условиях *in vitro*. Наблюдения проводятся каждые 7, 14, 21, 28 дней.

Таблица 4 Состав безгормональной среды при выращивании узлов Павловнии

Агар	7 г/л
Среда MS	4,4 г/л
Сахар	30 г/л
Клафоран	500 мг/л

Таблица 5 Состав гормоносодержащих сред

Наименование среды	Состав	Содержание гормонов, мг/л			
		BAР	NAA	2,4-D	Kin
2b (контроль)	Агар – 7 г/л, Среда MS – 4,4 г/л, Сахар – 30 г/л, Клафоран – 500 мг/л	-	-	-	-
1		8	0,3		
4b				0,1	5
4c				0,5	2
4d				0,5	5
4e			2		0,1
4f			5		0,1
4g			2		0,5
4i			5	0,2	
4j			10	0,2	
4k			5	0,5	
4l			10	0,5	

В таблице 6 приводится распределение видов Павловнии по высадке в ту или иную гормональную среду.

Таблица 6 Распределение видов Павловнии по высадке в ту или иную гормональную среду

	2b	1	4b	4c	4d	4e	4f	4g	4i	4j	4k	4l
Шан	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Тонг	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Гибрид	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Элонгата	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+

Поскольку на средах одного типа экспланты всех видов Павловнии ведут себя практически одинаково, качественные наблюдения можно обобщить по видам сред.

Среда 1

День 7

Появилось слабое каллусообразование, каллусы светло-зелёного цвета в основном в области среза черешка и сечения листовой пластины.

День 14

Каллусы разрослись, появился белесый налет, листовая пластина бугрится, видны зачатки корней.

День 21

Активные быстрорастущие корни с большим количеством коротких и длинных корневых волосков. Каллусы меняют цвет, желтеют и коричневеют. Листовая пластина становится пожухлой.

День 28

Каллусы коричневые. Листовая пластина с большими зонами некрозов. Корни сплелись и потемнели, рост не наблюдается.



Фото 1. Среда 1

Среда 2b

День 7

Наблюдается слабое каллусообразование в районе черешка и главного проводящего сосуда. Цвет листовой пластинки хороший, яркий, потемнений не наблюдается.

День 14

Наблюдаются слабые неразвивающиеся каллусы, мелкие, светло-зеленого, белесого цвета. Листовая пластинка сворачивается к центральной жилке листа.

День 21

Наблюдается слабое корнеобразование из области особо крупных каллусов. Корни тонкие короткие белого цвета, на концах ярко желтые.

День 28

Листовая пластина пожухла, наблюдаются некротические зоны, корни и каллусы потемнели.

Среда 4b

День 7

Каллусообразование и какие либо другие изменения не наблюдаются.

День 14

Каллусообразование наблюдается в области черешка и главного проводящего сосуда каллусы здорового зеленого цвета.

День 21

Каллус растет медленно, но сохраняет свой прежний вид и цвет.

День 28

Наблюдается слабое увядание, других изменений нет. Корнеобразования, как и побегообразования не наступило.

Выводы:

Среда 4c

День 7

Идет довольно активное каллусообразование. Каллусы светло-зелёного цвета в основном в области среза черешка и сечения листовой пластины, в областях главного и побочных проводящих сосудов.

День 14

Активное каллусообразование. Каллусы крупные зеленые растущие.

День 21

Продолжается активный рост каллусов, появляются корни, покрытые большим количеством корневых волосков.

День 28

Каллусы продолжают расти, но уже коричневеют. Корневая система развивается активно.



Фото 2. Среда 4с

Среда 4d

День 7

Каллусообразование средней скорости в основном в области черешка и главных проводящих сосудов. Каллусы зеленые с белым налетом.

День 14

Наблюдаются активно растущие зеленые и желтые каллусы с зачатками корней.

День 21

Активно растущая корневая система, корневых волосков нет. Корни длинные тонкие, происходящие из каллуса в области среза черенка и главных проводящих сосудов.

День 28

Наблюдается множество корней, покрытых небольшим количеством корневых волосков. Кончик корня имеет желтый окрас. Листовая пластина пожухлая с областями некроза.

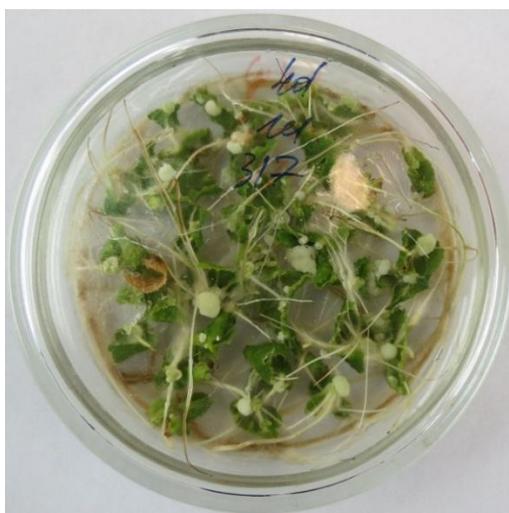


Фото 3. Среда 4d

Среда 4e

День 7

Слабое каллусообразование, в основном в районе среза черешка. Каллусы зеленого цвета.

День 14

Листовая пластина взбурилась, но не увядает. Каллусообразование идет медленно. Каллус практически не растет, но сохраняет свои внешние качества (равномерное нарастание на область среза, светло-зеленый цвет)

День 21

Появились корни небольшие, тонкие и слабые. Растут из образованного ранее каллуса на срезе черенка. Каллус внешне не изменился.

День 28

Корни длинные тонкие, небольшого количества. Корневые волоски отсутствуют. Черешок и главные проводящие сосуды обросли каллусом. Листовая пластина без признаков увядания, здорового зеленого цвета.

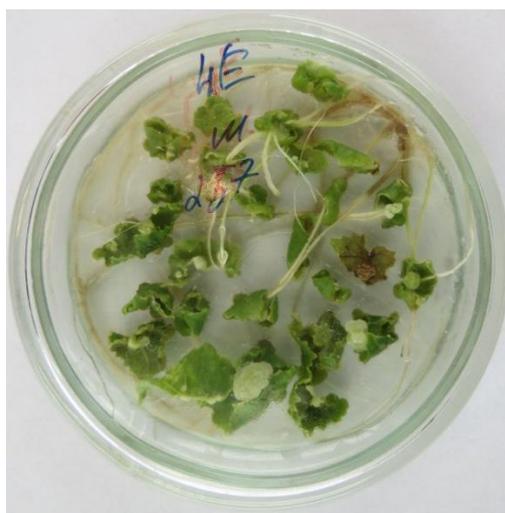


Фото 4. Среда 4e

Среда 4f

День 7

Каллусообразование практически не наблюдается. Видимых изменений нет.

День 14

Появились маленькие точки образования каллусов у среза черешка, в местах сечения листовой пластины, в районах крупных проводящих сосудов. Листовая пластина взбухла

День 21

Каллусы поменяли цвет со светло-зеленого на белый и молочный. Листовая пластина сильно закрутилась. Появились зачатки корня.

День 28

Каллусы окончательно приобрели белый цвет. Корней не много в основном не более 1 мм длиной, покрытые короткими, редкими волосками. Далее развитие не происходит.

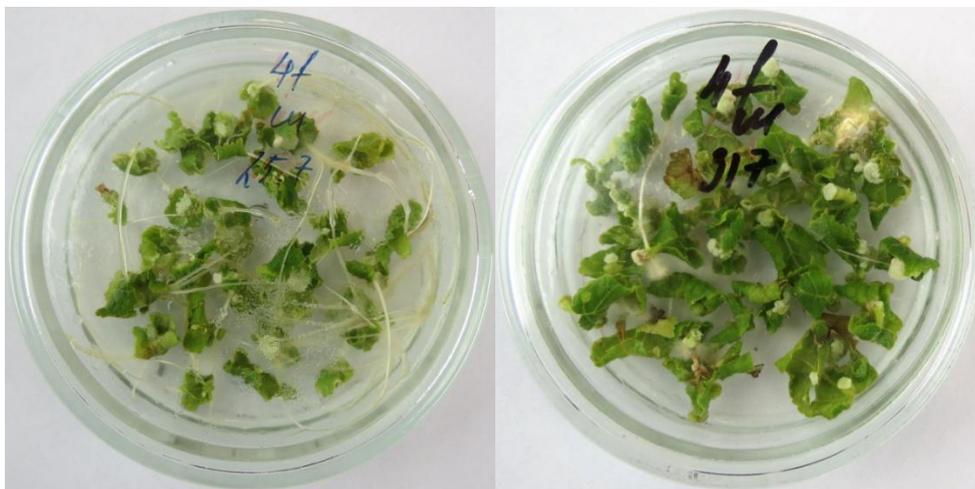


Фото 5. Среда 4f

Среда 4g

День 7

Слабое каллусообразование по всему телу листовой пластины. Крупных точек каллусообразования не наблюдается.

День 14

Листовая пластина стала бугристой, появились крупные очаги белых каллусов на срезах черешка и на линии сечения листовой пластины.

День 21

Каллус начал активно развиваться появились длинные корни с большим количеством коротких и редких корневых волосков. Листовая пластина начала желтеть.

День 28

Корни темнеют, начинают увядать. Листовая пластина желтеет. Каллусы коричневеют.



Фото 6. Среда 4g

Среда 4i

День 7

Видимых изменений практически нет. Слегка набух срез черешка. Листовая пластина сохраняет цвет и форму, наблюдаемую при высадке.

День 14

Каллус в месте среза черенка разросся и приобрел светло-зеленый цвет. Каллусы по срезам листовой пластины имеют вид бахромы и белый цвет.

День 21

Каллусы разрослись, цвет не поменяли. Листовая пластинка слегка бугрится.

День 28

Появляются мелкие побеги (3,4% и только на *Paulownia elongata*). Большинство каллусов осталось в прежнем виде. Некоторые из них (4-5%) дали 1-2 длинных разветвленных корня, покрытых редкими корневыми волосками.

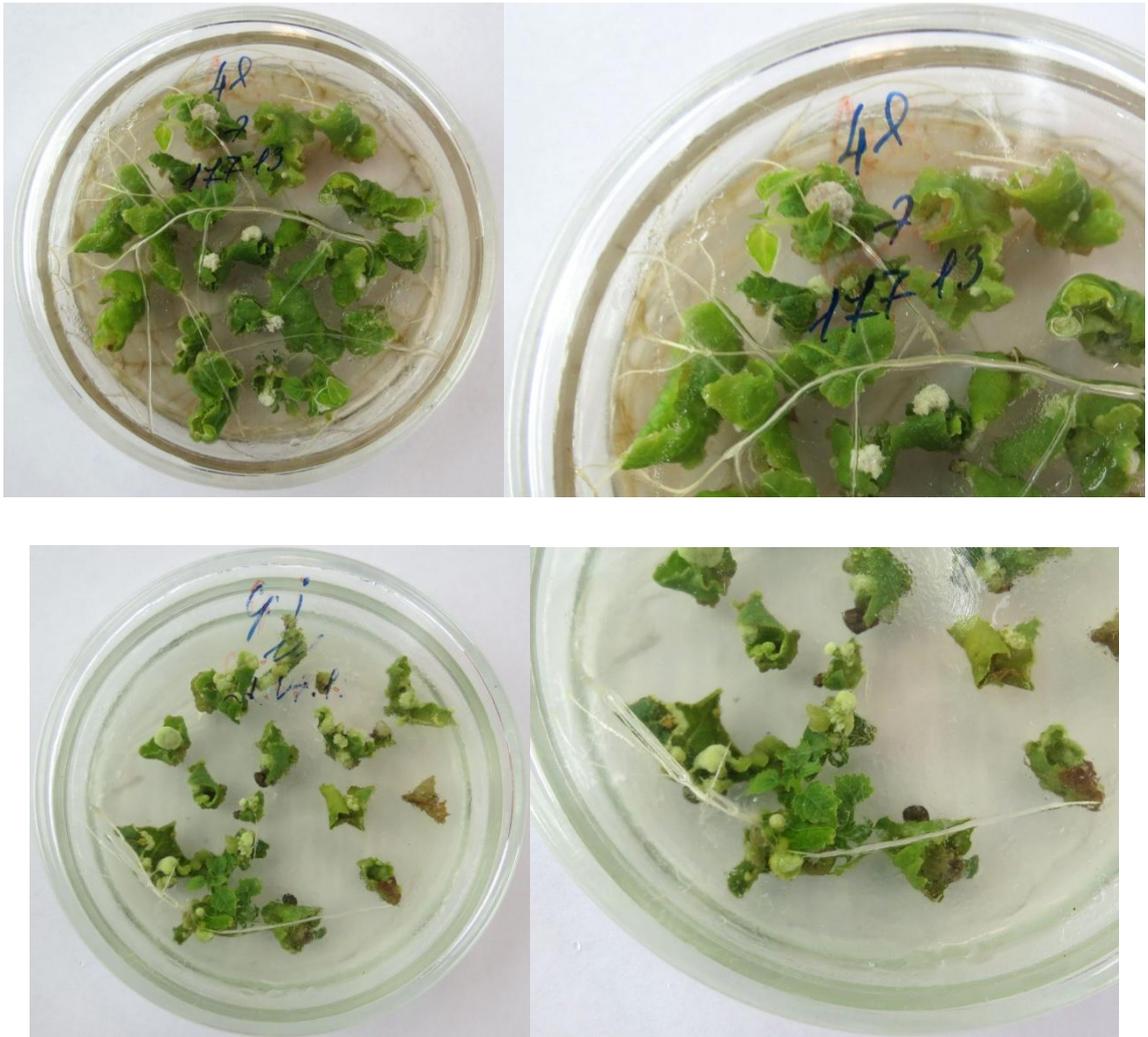


Фото 7. Среда 4i

Среда 4i

День 7

Образуются различного размера шишковидные каллусы белого цвета по всей поверхности листовой пластинки и в области среза черешка.

День 14

Каллусы разрослись и приобрели светло-зеленый цвет. Так же появились новые каллусы на поверхности листовой пластины сходной с более ранними каллусами формы. Листовая пластинка активно бугрится и сворачивается вокруг более крупных каллусных образований.

День 21

Каллус продолжает расти, зачатки корней не появляются. Листовая пластинка имеет здоровый зеленый цвет, так же как и при высадке.

День 28

Появляются мелкие побеги (7,3-8,5% на всех видах Павловнии). Большинство каллусов осталось в прежнем виде. Некоторые из них (3-4%) дали 1-2 длинных разветвленных корня, покрытых редкими корневыми волосками.

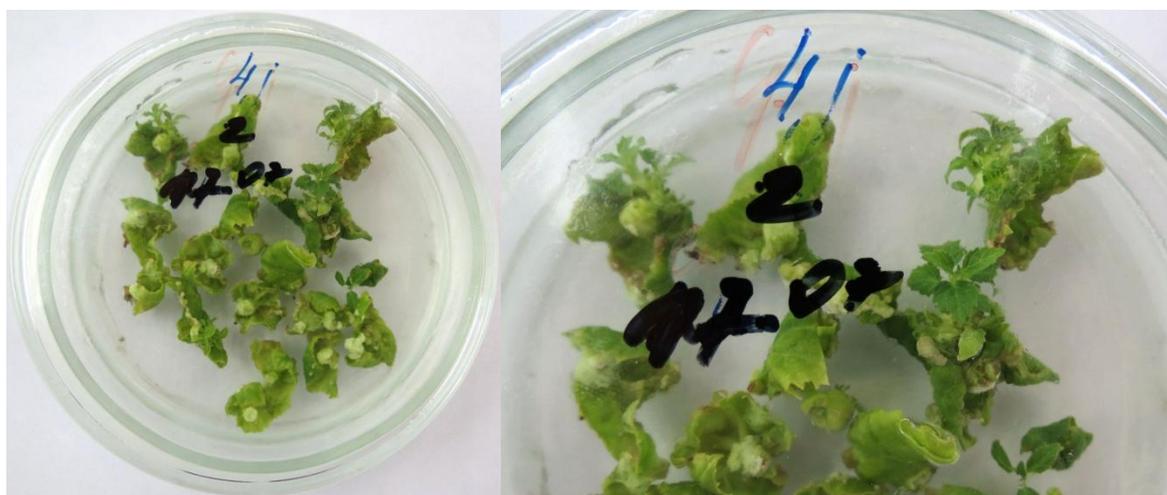
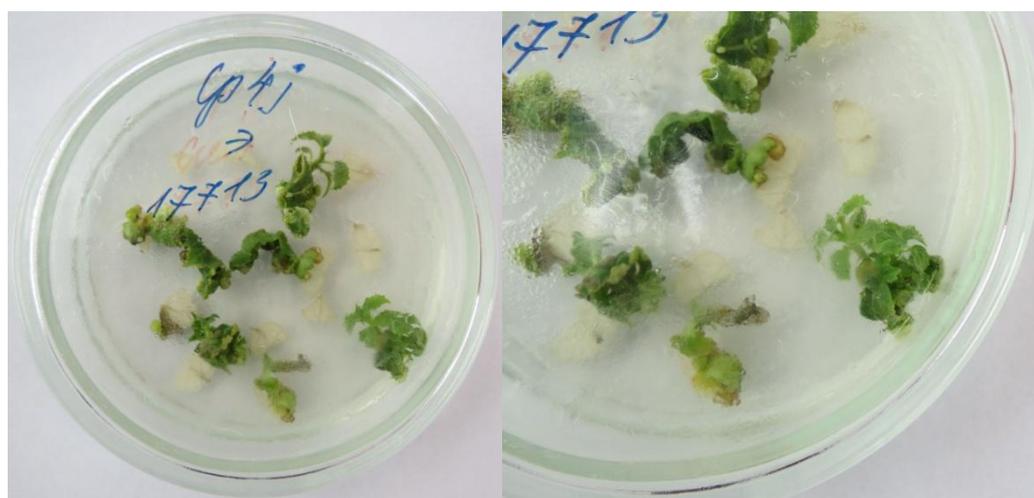


Фото 8. Среда 4j

Среда 4k

День 7

Слабое каллусообразование возникает в месте среза черенка и в области крупных проводящих жилок. Листовая пластина бугрится.

День 14

Каллусы растут медленно. Значительных изменений не наблюдаю. В черешковой области видны зачатки 1-2 корней.

День 21

Околочерешковые каллусы дали 1-2 длинных разветвленных корня покрытых короткими корневыми волосками. Листовая пластинка начала бугриться, немного поблекла, но все еще остается зеленой.

День 28

На корнях и листовых пластинках появляются темные (черные и коричневые) области, заметно увядание импланта. Каллусы коричневеют.



Фото 9. Среда 4к

Среда 4л

День 7

Каллусообразование происходит повсеместно на обеих поверхностях листовой пластины. Крупные образования имеются на местах срезов черешков и в местах сечения листовой пластины.

День 14

В каллусообразование вовлечена вся листовая пластинка. Зрительно ткань стала хрупкой и рыхлой. Каллусы активно разрастаются, имеют зеленый цвет.

День 21

Каллусы крупные видны зачатки корней. Листовая пластинка бугрится.

День 28

Появились редкие, но длинные и разветвленные корни, покрытые короткими редкими корневыми волосками. Кончик корня имеет ярко желтый цвет. Листовая пластина выглядит пожухлой.



Фото 10. Среда 41

Удобнее всего вести наблюдение по видам Павловнии, имея в виду спектр гормональных сред, использованных для каждого вида Павловнии (см. таб. 6). Сводные результаты по общему количеству эксплантов, количеству чашек Петри, новообразовавшихся побегов и образовавшихся корней представлены по видам Павловнии в таблицах 7-10.

Таблица 7 Сводные результаты по Павловнии Шан Тонг

Наименование среды	Кол-во чашек Петри	Среднее кол-во кусков листа в одной чашке Петри	Общее кол-во кусков листа	Кол-во новообразовавшихся побегов	% новообразованных побегов	Среднее кол-во кусков листа, образовавшихся корни	% кусков листа, образовавшихся корни
2b	3	20	60	-	0 %	35	58 %
1	17	22	264	-	0 %	180	68,2 %
4b	2	23	46	-	0 %	-	0 %
4c	16	21	336	-	0 %	276	82,1 %
4d	1	25	25	-	0 %	20	80 %
4e	7	25	175	-	0 %	130	74,3 %
4f	3	23	69	-	0 %	30	43,5 %
4g	4	22	88	-	0 %	54	61,4 %
4i	2	20	40	-	0 %	2	5 %
4j	6	16	96	7	7,3 %	4	4,1 %
4k	3	24	72	-	0 %	33	48,8 %
4l	5	24	120	-	0 %	60	50 %

Таблица 8 Сводные результаты по Павловнии Гибрид

Наименование среды	Кол-во чашек Петри	Среднее кол-во кусков листа в одной чашке Петри	Общее кол-во кусков листа	Кол-во новообразованных побегов	% новообразованных побегов	Среднее кол-во кусков листа, образовавшихся корни	% кусков листа, образовавшихся корни
1	12	20	240	-	0 %	173	72,1 %
4d	1	21	21	-	0 %	18	85,7 %
4e	1	24	24	-	0 %	17	70,8 %
4f	1	25	25	-	0 %	10	40 %
4g	3	22	66	-	0 %	40	60,6 %
4j	2	23	46	4	8,7 %	2	4,4 %
4k	4	24	96	-	0 %	38	39,6 %
4l	1	25	25	-	0 %	12	48 %

Таблица 9 Сводные результаты по Павловнии Элонгата

Наименование среды	Кол-во чашек Петри	Среднее кол-во кусков листа в одной чашке Петри	Общее кол-во кусков листа	Кол-во новообразованных побегов	% новообразованных побегов	Среднее кол-во кусков листа, образовавшихся корни	% кусков листа, образовавшихся корни
1	4	23	92	-	0 %	71	77,2 %
4c	1	23	23	-	0 %	20	87 %
4d	3	23	69	-	0 %	60	87 %
4e	4	25	100	-	0 %	70	70 %

4g	3	22	66	-	0 %	43	65,2 %
4i	4	22	88	3	3,4 %	4	4,5 %
4j	3	20	60	5	8,3 %	2	3,3 %
4k	2	22	44	-	0 %	15	34,1 %
4l	3	25	75	-	0 %	30	40 %

Таблица 10. Сводная таблица результатов по видам сред:

Наименование среды	Действие на имплант		
	Каллусообразование	Корнеобразование	Побегообразование
2b	-	+	-
1	+	+	-
4b	-	-	-
4c	+	+	-
4d	+	+	-
4e	+	+	-
4f	+	+	-
4g	+	+	-
4i	+	+	+
4j	+	-	+
4k	-	+	-
4l	-	+	-

Список используемой литературы:

Банникова В.П., Сидорова Н.В., Колочая Г.С. и др. Регенерация растений из каллусных тканей незрелых гибридных зародышей пшеницы

Батыгина Т.Б. Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей// Физиология растений.

Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений.

Бутенко Р.Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений.

Бутенко Р.Г. Индукция морфогенеза в культуре тканей растений. В сб. Гормональная регуляция онтогенеза растений. М., 1984.

Бутенко Р.Г. Клеточные технологии в селекционном процессе / Состояние и перспективы развития сельскохозяйственной биотехнологии. Л. 1986. С.29-38.

Бутенко Р.Г. Биология культивируемых клеток и биотехнология растений

Диас С., Долгих Ю.И., Шамина З.Б., Шевелуха В.С. Значение физиологических и генетических факторов в индукции эмбриогенного каллуса у разных линий кукурузы//

Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений.

Каримова Ф.Г., Тарчевская О.И. Леонова С.А. Регуляция протеинкиназ фитогормонами // Регуляторы роста и развития растений.

Кучеренко Л.А. Каллусогенез, выход и характеристика регенерирующих растений риса в культуре ткани в зависимости от гормонального состава индукционной среды

Полевой В.В. Фитогормоны

Полевой В.В., Саламатова Т.С. Физиология роста и развития растений

Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция.

Токин Б.П. Морфогенетические процессы при бесполом размножении, соматическом эмбриогенезе и регенерации.

Хадеева Н.В., Яковлева Е.Ю., Авдиенко И.Д. и др. Исследование культуральной жидкости бактерий-продуцентов растительных гормонов для стимуляции органогенеза при микроклональном размножении растений

Хотылева Л.В., Матвеев С.Н., Рубан В.В. и др. Особенности структуры цитоплазматических органелл в клетках каллуса и регенерантов гетерозисных гибридов тритикале

Шамина З.Б. Особенности генетической изменчивости соматических клеток растений // Биотехнология

Шарова А.П., Давыдова Ю.В. Мелик-Саркисов О.С.
Морфогенетическая активность различных типов эксплантов картофеля в культуре *in vitro*

Шахов А.А. Фотоэнергетика растений и урожай. Световая технология культуры клеток и тканей

Юмагужин М.С., Фатхутдинова Р.А., Золотова Г.М., Ахметов Р.Р.
Хромосомный анализ каллусной ткани и регенерантов из различных тканей гречихи в культуре *in vitro*.

Ammirato P.V. Hormon control of somatic embryo-development from cultured cells of Caraway

Arnold S., Nakman I. Regulation of somatic embryo development in Picea abies by Absciscic acid (ABA).

Barakat M.N., Adbel-Latif T.H. In vitro selection of wheat callus tolerant to high levels of salt and plant regeneration

Barkla B J., Vera-Strella R., Maldonado-Gama M. et al. Absciscic acid induction of vacuolar H⁺-ATPase activity in Mesembryanthemum erythraeum is developmentally regulated

Chen L., Luthe D.S. Analysis of proneins from embryogenic and nonembryogenic rice

D'Amato F. Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerates.

Duncan D.R., Widholm J.M. Cell Selection for crop improvement

Einset J. W., Skoog F. Biosynthesis of cytokinins in cytokinin autotrophic tobacco callus.

Fowke L., Attree S. Applications of embryogenic spruce cultures for applied and fundamental research

Galiba G., Sutka J. Frost resistance of somaclones derived from *Triticum aestivum* L. winter wheat calli

Ganeshan S., Scoles G.L. In vitro selection for net blotch resistance in barley
Green C.E. Somatic embryogenesis and plant regeneration from the friable callus of *Zea mays*; Proc. 5th Int. Cong

Green C.E., Phillips R.L. Plant regeneration from tissue culture of maize

Hakman I., Arnold S. Somatic embryogenesis and plant regeneration from suspension culture of *Picea glauca* (White Spruce)

Hartman C., Buysy J., Henry Y. et al. Time-course of mitochondrial genome variation in wheat embryogenic somatic tissue cultures

Hicks G.S. Pattern of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination.

Jitender S.Y., Manchikatta V.R. Temporal regulation of somatic embryogenesis by adjusting cellular polyamine content in eggplant

Jones M.G. Karp A. Plant tissue culture technology and crop improvement

Mishkind M., Keegstra K., Barry A. Distribution of wheat germ agglutinin in young wheat plants

Pedrosa L.F., Vasil I.K. Optimization of somatic embryogenesis and long term regeneration in callus cultures of diploperennial tiosinte

Plazek Agneieska. Ocena odpornosci kalusa kostrzewy lakowe.

Raval M., Chattoo B. Role of media constituents and proline in callus growth, somatic embryogenesis and regeneration of *Oryza sativa* cv Indica

Sasaki K., Schimomura K., Kamada H., et al. Metabolism in embryogenic and non embryogenic carrot cells

Sears R.J., Deckard E.L. Tissue cultural variability in wheat: callus induction and Plant

Shimada T., Yamada Y. Wheat plants regenerated from embryo cell cultures
Vain P., Yean H., Flament P. Enhancement of production and regeneration
of embryogenic type 2 callus in *Zea mays* L.H Plant Cell, Tissue and Organ Cult

Vasil I.K. Developing cell and tissue culture system for the improvement of
cereal and grass crops

Vasil V., Vasil I., Chin-vi Lu. Somatic embryogenesis in longterm callus
cultures of *Zea mays* L.

Vasil I.K., Scowcraft N.R., Frey K.J. Somatic embryogenesis and plant
regeneration in cereals and grasses

Wang W.C. et al. A comparison of hard wheat suspension cultures
containing clumps and single cell

Wang W.C. et al. Effect of culture medium and auxin source on hard wheat
suspension cultures containing clumps and single cell

Wang W.C., Nguyen H.T. A Novel approach for efficient plant regeneration
from long-term suspension culture of wheat

Wernicke W., Gorst J., Milkovits L. The ambiguous role of 2,4-
dichlorophenoxyacetic acid in wheat tissue culture

White G.A., Taniguchi E. The mode of action of Helminthosporal.. Effect on
the permeability of plant cell membranes

Zun Z., Zhao C., Zheng K. et al. Somaclonal genetic of rice, *Oryza sativa*
L.H TAG.

<http://www.biotechnolog.ru/>

<http://bio-technology.nm.ru/micropropagation.htm>