

**Учреждение образования
«Брестский государственный университет имени
А. С. Пушкина»**

ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

**Электронный учебно-методический комплекс
для студентов специальности
7-06-0511-01 Биология
Брест
БрГУ имени А. С. Пушкина**



УДК 575(075.8)

ББК 28.04

Рецензенты:

кафедра плодовоовощеводства УО «Белорусская государственная орденов
Октябрьской Революции и Трудового Красного Знамени
сельскохозяйственная академия»
доцент кафедры инженерной экологии и химии УО «Брестский
государственный технический университет», кандидат биологических наук,
доцент **В. Н. Босак**

Составители:

доцент кафедры биологических и химических технологий, кандидат
биологических наук, доцент **С. М. Ленивко**
декан факультета повышения квалификации ГУО «Брестский областной
институт развития образования» кандидат биологических наук, доцент **В.
И. Бойко**

Гормональная регуляция развития растений [Электронный ресурс] :
электрон. учеб.-метод. комплекс / Брест. гос. ун-т им. А. С. Пушкина ;
сост. С. М. Ленивко, В. И. Бойко. – Брест : БрГУ, 2025. – Режим доступа:
rep.brsu.by.

Электронный учебно-методический комплекс подготовлен с целью
оптимизации овладения студентами профессиональными компетенциями в
рамках учебной дисциплины «Гормональная регуляция развития растений».
Содержит необходимые методические материалы для освоения содержания
учебного материала дисциплины, выполнения лабораторных заданий,
подготовки к зачету.

Адресуется студентам специальности 7-06-0511-01 Биология.

Сделан в формате html.

УДК 575(075.8)
ББК 28.04

© УО «Брестский государственный
университет имени А. С. Пушкина», 2025

СОДЕРЖАНИЕ

Введение

Содержание учебного материала

Лекционный материал

Тема 1. Введение

Тема 2. Фитогормональная сигнализация

Тема 3. Фитогормоны в культуре *in vitro*

Тема 4. Применение фитогормонов в агротехнологиях

Практикум

Практическое занятие 1. Фитогормональная сигнализация

Практическое занятие 2. Фитогормоны в культуре *in vitro*

Практическое занятие 3. Применение фитогормонов в агротехнологиях

Тестовые задания

Вопросы к зачету

Список использованной литературы

Список рекомендуемой литературы



ВВЕДЕНИЕ

Дисциплина «Гормональная регуляция развития растений» направлена на формирование знаний о структурно-функциональных особенностях важнейших фитогормонов, принципах их рецепции, сигнальной трансдукции и генерации первичного ответа в клетках растений, а также способности применять их для развития новых направлений исследований, для решения учебных и профессиональных задач на основе развития личностно-ценных, социально значимых качеств обучающихся, получающих углубленное высшее образование по специальности 7-06-0511-01 Биология.

В результате изучения дисциплины студенты должны **знать**:

- основные группы фитогормонов, их роль в экспрессии генов, регуляции физиологических процессов растений,
- возможности использования фитогормонов в биотехнологии и растениеводстве.

Студенты должны **уметь**:

- применять знания о важнейших фитогормонах и принципах их функционирования для понимания происходящих в растительном организме процессов и для планирования и проведения научных экспериментов по решению проблем фитогормональной регуляции;
- составлять питательные среды для культивирования изолированных органов и тканей растений в условиях *in vitro*;
- использовать методы культуры *in vitro* в биотехнологии растений;
- разумно сочетать труд и отдых, быть готовым к напряженному труду;
- проявить социальную активность, лидерские качества в решении поставленных задач.

Студенты должны **владеть**:

- терминологическим аппаратом дисциплины;
- навыками поиска и получения научной информации об особенностях молекулярно-генетических механизмов действия гормонов у различных видов растений;
- экспериментальными приемами управления процессами роста и развития растений путем использования природных фитогормонов и синтетических регуляторов;
- информацией по актуальным вопросам современного состояния развития биологической науки в Республике Беларусь.
- культурой трудовой деятельности в современных условиях;
- стремлением к самопознанию, самосовершенствованию и самореализации.

Учебно-методический комплекс (далее – УМК) составлен на основе учебной программы по учебной дисциплине «Гормональная регуляция развития растений» модуля «Клеточная биология и молекулярно-генетические основы регуляции развития растений» компонента учреждения образования специальности 7-06-0511-01 Биология.

Основная дидактическая цель УМК – оказание методической помощи

студентам посредством создания информационно-образовательной среды при овладении профессиональными компетенциями в рамках учебной дисциплины «Гормональная регуляция развития растений». УМК включает следующие блоки: теоретический, практический, контроля знаний, вспомогательный. Теоретический блок представлен лекционным материалом, при написании которого была использована, переработана и адаптирована информация учебной и научной литературы. Лекционный материал содержит основную информацию по всем 4 темам учебной программы. Тезисная форма его изложения, акцентирование внимания на терминах, включение наглядных опорных схем упрощают восприятие информации и позволят студентам выбрать оптимальный темп для освоения изучаемой дисциплины. Использование подготовленного УМК в сочетании с мультимедийным сопровождением во время лекций позволит студентам в большей мере сосредоточиться на понимании изучаемого материала по дисциплине, а не на его конспектировании. Практический блок представлен лабораторным практикумом, материал которого позволит обучающимся успешно справиться с заданиями как во время учебных занятий, так и в процессе самоподготовки. В блок контроля вошли тестовые задания, вопросы и задания для самоконтроля, темы для реферативных сообщений, вопросы к зачету. Вспомогательный блок включает содержание учебного материала и список рекомендуемой литературы. Материал УМК по мере необходимости можно совершенствовать и дополнять, используя новые методические, творческие, технические, программные и информационные возможности.

Использование УМК предполагает следующий алгоритм работы. На первом этапе студент должен ознакомиться с текстом соответствующей лекции, затем подойти осознанно к усвоению теоретического материала. На втором этапе для приобретения умений и навыков необходимо выполнить практические задания практикума. На третьем этапе должен быть осуществлен контроль качества приобретенных знаний с использованием тестовых заданий. Организация подготовки магистранта к зачету по учебной дисциплине происходит на четвертом этапе по представленным в УМК вопросам.

Предлагаемый в УМК материал рассчитан на 50 аудиторных часов (36 часов лекционных, 14 часов практических занятий). Итоговой формой контроля знаний студентов является зачет.

СОДЕРЖАНИЕ УЧЕБНОГО МАТЕРИАЛА ПО РАЗДЕЛУ «МОРФОЛОГИЯ И АНАТОМИЯ РАСТЕНИЙ»

I. РАСТИТЕЛЬНЫЕ ТКАНИ

Тема 1. Введение

Обзор фитогормонов: классические гормоны растений, брассиностероиды и жасмонаты – новые фитогормоны, салицилаты и стриголактоны – кандидаты в фитогормоны. Зависимость гормональной активности от химического строения молекул.

Тема 2. Фитогормональная сигнализация

Полярный транспорт ауксинов. Рецепция и передача сигнала ауксинов. Гены первичного ответа на ауксины. Функции ауксинов в развитии растений.

Транспорт цитокининов. Рецепция и передача сигнала цитокининов. Гены первичного ответа на цитокинины. Функции цитокининов в развитии растений.

Рецепция и передача сигнала гиббереллинов. Гиббереллин-регулируемые гены. Функции гиббереллинов в развитии растений.

Рецепция и передача сигнала этилена. Этилен-зависимые транскрипционные факторы. Функции этилена в развитии растений.

Рецепция и передача сигнала абсцизовой кислоты. Транскрипционные факторы-мишени сигнальной трансдукции абсцизовой кислоты. Функции абсцизовой кислоты в развитии растений.

Тема 3. Фитогормоны в культуре in vitro

Зависимость дедифференцировки растительной клетки от присутствия в питательной среде фитогормонов. Гормональная индукция каллусогенеза. Взаимодействие фитогормонов в культуре тканей растений и управление морфогенезом каллусов in vitro. Гормональная регуляция побегообразования. Гормональная регуляция ризогенеза.

Применение модельных систем на основе изолированных органов in vitro для исследования действия фитогормонов. Гормональная регуляция регенерации при микроклональном размножении растений.

Тема 4. Применение фитогормонов в агротехнологиях

Фитогормоны и синтетические регуляторы роста в растениеводстве. Регуляция корнеобразования и размножения растений, покоя и прорастания, роста органов, цветения, опыления, оплодотворения, опадения органов, завязывания, развития и созревания плодов, габитуса растений, устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам.

Тематический план

№ темы	Название темы	Количество аудиторных часов		
		всего	лекции	практические

				занятия
1	Введение	4	4	
2	Фитогормональная сигнализация	14	10	4
3	Фитогормоны в культуре in vitro	18	12	6
4	Применение фитогормонов в агротехнологиях	14	10	4

ЛЕКЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ

Тема 1. ВВЕДЕНИЕ

1.1. Обзор фитогормонов

Рост и развитие растений обусловлены наследственностью и управляются с помощью специфических физиологически активных веществ – *фитогормонов*. Они образуются в процессе обмена веществ растений и оказывают в очень малых количествах регуляторное и координирующее влияние на физиологические процессы в разных органах растения.

Общими свойствами фитогормонов являются следующие:

- 1) гормоны – это высокоактивные вещества, действующие в очень малых концентрациях (примерно 10-5 моль/л и меньше);
- 2) гормоны вырабатываются в одних частях растения и передвигаются в другие его части, где и проявляют свое действие;
- 3) каждый фитогормон участвует в регуляции многих физиологических процессов, т. е. обладает полифункциональными свойствами.

Система гормональной регуляции жизнедеятельности растений многокомпонентна, и в ней принимает участие не один, а несколько гормонов. Фитогормоны образуются преимущественно в меристематических тканях, а также в листьях и из них перемещаются, прежде всего, в те части растения, где происходят различные ростовые или формообразовательные процессы. Действие фитогормонов заключается в изменении программы развития, что выражается комплексным изменением активности клеток и тканей: рост, растяжение, синтез пептидов и всевозможных метаболитов.

Гормоны являются первичными мессенджерами в сигнальных путях. Они связываются с рецепторами на клеточной мембране или внутри клетки, и дальше по каскаду вторичных мессенджеров информация передается до конкретной эффекторной системы.

Среди фитогормонов различают стимуляторы и ингибиторы роста. К стимуляторам роста относятся ауксины, гиббереллины и цитокинины. Природными ингибиторами выступают салициловая, бензойная, коричная и абсцизовая кислоты, кумарин и некоторые другие вещества. Стимуляторы роста, применяемые в сверхоптимальных дозах, способны подавлять ростовые процессы, поэтому становятся ингибиторами.

Ауксины контролируют полярность развития всех органов растения и тропизмы – «гормоны направлений», стимулируют деление и растяжение клеток, необходимы для дифференцировки клеток, закладки проводящих пучков и образования корней и ряд других физиологических процессов.

Главным представителем ауксинов в растениях является индолил-3-уксусная кислота (ИУК, или IAA (Indole-3-acetic acid)) – производное индола. Получены также синтетические вещества различного строения с ауксиновой активностью (2,4-дихлорфеноксиуксусная, 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная, индолил-3-масляная, 1-нафтилуксусная кислоты и др.).

Известно несколько путей синтеза ИУК из триптофана через ряд промежуточных соединений. В основном пути аминокислота L-Trp под действием трансаминазы превращается в индолил-3-пировиноградную кислоту (IPA), которая после декарбоксилирования через индолил-3-ацетальдегид (IAAld) под действием альдегидоксидазы переходит в ИУК (IAA): $\text{Trp} \rightarrow \text{IPA} \rightarrow \text{IAAld} \rightarrow \text{IAA}$.

Синтез ИУК осуществляется в точках роста и, прежде всего, в апикальных меристемах побегов, в семядолях и молодых листьях, а также растущих зародышах и семяпочках. Много индолилуксусной кислоты содержат запасающие ткани семян, пыльца.

Помимо растений, способностью к биосинтезу ИУК обладают некоторые грибы и патогенные бактерии родов *Agrobacterium* и *Pseudomonas*.

Существует несколько путей инактивации и депонирования избытка ИУК в виде запасных форм – индолбутировой кислоты, а также конъюгатов со специфическими сахарами и белками. Разрушается ИУК ферментом ИУК-оксидазой путем окисления в присутствии молекулярного кислорода.

Ауксины, как и другие фитогормоны, в малых концентрациях стимулируют рост, а в больших – ингибируют его. Последний эффект позволяет в агротехнологиях использовать синтетические аналоги ауксинов в качестве гербицидов.

Функции ауксинов многообразны и связаны с такими характеристиками этих гормонов, как наличие полярного транспорта, стимуляция работы ионных каналов и контроль экспрессии определенных генов. Так основной полярный транспорт ауксинов от клетки к клетке в нисходящем направлении определяется наличием специальных трансмембранных переносчиков и имеет важное значение при развитии и закладке разных частей растения. Другой важный физиологический эффект природного ауксина ИУК связан с активацией протонной помпы в плазмалемме, что приводит к закислению и разрыхлению клеточных стенок, делает их более эластичными путем разрыва водородных связей между молекулами целлюлозы. В возникающие при этом промежутки и разрывы оболочки клеток откладываются новые молекулы целлюлозы, тем самым происходит их растяжение. Также места синтеза и накопления ауксинов привлекают потоки питательных веществ, необходимых для деления и роста клеток. Комплекс ИУК с рецептором транспортируется в ядро и активирует синтез РНК, что в свою очередь приводит к усилению синтеза специфических белков.

Цитокинины – гормоны растений 6-аминопуринового ряда, обнаруженные благодаря их способности стимулировать клеточное деление (цитокинез) в середине XX века. Первый искусственно полученный цитокинин (6-фурфриламинопурин) проявил свою биологическую активность в отношении пролиферации клеток в условиях *in vitro*, поэтому получил название – кинетин (от сдлва «деление»). Вскоре был выделен из эндосперма кукурузы (*Zea*) первый природный цитокинин – зеатин, и за цитокининами закрепилось название «гормоны деления клетки», хотя физиологические функции их значительно шире.

Биосинтез цитокининов в растениях, представляющий собой сеть процессов, был доказан лишь в конце XX века. Предшественниками биосинтеза цитокининов являются АТФ и АДФ, а также тРНК.

Цитокинины образуются путем конденсации аденозин-5-монофосфата и изопентенилпирофосфата, причем разные этапы биосинтеза осуществляются в разных тканях растения. Ключевым моментом является первая стадия, когда образуется связь аденина с изопентенилом с участием фермента изопентенилтрансферазы (IPT). Синтезированные апикальной меристемой корня цитокининовые нуклеотиды обладают слабой физиологической активностью и транспортируются по ксилеме в точки роста побегов, где превращаются в активные свободные цитокинины путем отщепления рибозы и фосфатной группы. Имеются локальные зоны биосинтеза цитокининов в развивающихся семенах и плодах, почках, молодых листьях.

Помимо растений, к синтезу цитокининов способны некоторые фитопатогенные бактерии родов *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Pantoea* и грибы, что помогает им воздействовать на клетки растения-хозяина.

Цитокинины индуцируют в присутствии ауксина деление клеток, активируют дифференциацию пластид, повышают активность АТФ-синтетазы, способствуют выходу почек, семян и клубней из состояния покоя, предотвращают распад хлорофилла и деградацию клеточных органелл. Комплекс цитокининов с белковым рецептором повышает активность РНК-полимеразы и экспрессию генов. При этом увеличивается число полисом и активируется синтез белка. Цитокинины повышают устойчивость растений к неблагоприятным внешним воздействиям.

Цитокинины обладают так называемым аттрагирующим эффектом, вызывая приток аминокислот, фосфатов и других соединений к месту, где они используются на процессы роста.

Экзогенные цитокинины задерживают старение листьев растений. Их действие распространяется на структурное и функциональное состояние клеток листа: увеличивается размер ядер, ядрышек, число рибосом, число крист в митохондриях и ламелл стромы хлоропластов, разрастается эндоплазматическая сеть. Это приводит не только к активизации физиологических процессов в листе (синтеза нуклеиновых кислот, белков, хлорофилла и других веществ, интенсивности фотосинтеза), но и к полной перестройке всего метаболизма листа и структурной его организации. С помощью цитокининов можно существенно увеличить время активной жизнедеятельности листа, его фотосинтетическую продуктивность, а также излечить поврежденный тем или иным фактором или болезнью листовой аппарат растений.

Цитокинины влияют и на физиологическое состояние семян и почек, в частности, на процессы, связанные с периодом покоя, индуцируют образование придаточных почек у каллусов.

Гиббереллины – самый обширный класс фитогормонов дитерпеновой природы, первые соединения которого были выделены в 1935 г. из сумчатого гриба *Gibberellia fujikuroi*, паразитирующего на растениях риса. В настоящее время из тканей различных растений получено более 100 гиббереллинов, но лишь у небольшого числа обнаружена биологическая активность, связанная со стимулированием вегетативного и генеративного развития (контролем удлинения гипокотилия, прорастания семян, зацветания и т. д.). Показано, что большинство веществ этого класса фитогормонов является предшественниками в биосинтезе активных гиббереллинов либо продуктами их инактивации. Наиболее известным и распространенным гиббереллином с высокой активностью является гибберелловая кислота

(ГАЗ).

Основные места синтеза гиббереллинов – молодые листья и листовые примордии, поэтому их называются «гормонами листа», но они также могут синтезироваться и в других активно растущих органах (корнях, цветках). Биосинтез гиббереллинов – сложный многоэтапный процесс, разделенный по нескольким компартментам клетки: начальные стадии протекают в пластидах, конечные – в ЭПР и цитоплазме. Несмотря на длительный и разветвленный путь биосинтеза гиббереллинов, в нем задействовано небольшое количество ферментов. Такая особенность достигается за счет невысокой субстратной специфичности большинства из них.

Предшественником всех гиббереллинов, как и дитерпеноидов, хлорофилла и абсцизовой кислоты, является геранилгеранилдифосфат (ГГДФ). В пропластидах меристематических тканей ГГДФ претерпевает циклизацию с образованием энт-каурена – типичного дитерпеноида, имеющего общий для всей группы гиббереллинов углеводородный скелет из 20 атомов, составляющих четыре изопреновых фрагмента. Циклазы, катализирующие этот процесс, присутствуют только в пропластидах меристематических тканей.

Энт-каурен направляется в ЭПР, где претерпевает последовательное окисление до ГА12 – промежуточного продукта, у которого второе кольцо является пятичленным в отличие от энт-каурена. Дальнейшее окисление и преобразование промежуточного продукта происходит в цитоплазме в разнообразные гиббереллиновые формы по двум путям: по первому, характерному для большинства растений, в С13-положении вводится гидроксильная группа, а по второму гидроксирование не происходит. Первый путь приводит к образованию биологически активного гиббереллина ГК1, а второй – ГК4. Гиббереллины делаются активными после формирования лактонного кольца.

Гиббереллины участвуют в контроле различных физиологических процессах, при этом чаще проявляют синергизм с ауксинами, при некоторых различиях, и являются антогонистами цитокининов и абсцизовой кислоты.

Этилен – первый из обнаруженных в начале XX века газообразных гормонов, представляет собой низкомолекулярное соединение, по основному характеру воздействия является «гормоном механического стресса», поскольку его синтез в органах растений усиливается в ответ на разного рода повреждения (поранение, атака патогена).

Биосинтез этилена происходит во всех органах и тканях растений на разных этапах онтогенеза с различной скоростью, усиливается на ранних стадиях развития проростка, на этапе старения и во время стресса. Отмечено также, что биосинтез этилена регулируется циркадными ритмами (максимальный в полдень), а также другими фитогормонами (стимулируется ауксинами и цитокининами, тормозится гиббереллинами).

Предшественником для биосинтеза этилена в растениях является аминокислота метионин. На первом этапе взаимодействие метионина с макроэргическим соединением АТФ приводит к образованию промежуточного продукта AdoMet (S-аденозил-метионин) – источника метильной группы для большинства процессов метилирования. На втором этапе АЦК-синтаза превращает его в 1-аминоциклопропан-1-карбоновую кислоту (АЦК или АСС) – непосредственный предшественник этилена в

растениях, представляющий собой его неактивную транспортную форму. Завершающий этап биосинтеза сводится к окислению АЦК ферментом АЦК-оксидазой с образованием этилена. Однако в этилен превращается не вся АЦК, часть ее может образовывать очень устойчивую конъюгированную форму – N-малонил-АЦК. Источником пополнения запасов метионина в клетках является цикл Янга, в ходе которого $\text{CH}_3\text{--S-}$ группа, остающаяся от метионина после синтеза АЦК, вновь используется для его образования.

К числу наиболее известных функций этилена относятся развитие тройного ответа у этиолированных проростков после обработки этим гормоном, старение цветков, созревание плодов. Тройной ответ – это угнетение роста побега (укорочение и утолщение), нарушение геотропизмов (апикальный крючок или резкий изгиб верхней части гипокотыля), ингибирование роста главного корня.

Абсцизовая кислота (АБК) – гормон-ингибитор терпеноидной природы. Свое название она получила от английского слова *abscission* – «опадение, отделение», т. к. ее накопление вызывает образование отделительного слоя в основании черешков и плодоножек, что приводит к опадению листьев и плодов. Исходным веществом в биосинтезе АБК служит, как и для синтеза гиббереллина, мевалоновая кислота, в свою очередь являющаяся побочным продуктом в процессе синтеза каротиноидов.

АБК – вещество с широким спектром активности. Являясь антагонистом гиббереллинов, ауксинов и цитокининов, она выполняет важные функции контроля ростовых процессов. Участвует АБК и в движении устьиц, в ингибировании или активировании процессов карбоксилирования и ряда других. Специфическое воздействие АБК проявляется, главным образом, через разрывы цепи: активация генов ДНК – иРНК – фермент – продукт. Эти разрывы могут происходить в нескольких местах указанной цепочки реакций. Следовательно, АБК затрагивает генные регуляции превращений органических веществ в растениях.

Передвигается АБК преимущественно по флоэме, а также по ксилеме растений, и в связи с этим она вездесуща, проникает во все ткани и клетки растительного организма.

Кроме перечисленных пяти классических гормонов растений, новыми фитогормонами являются брассиностероиды и жасмонаты, а также выделяют кандидаты в фитогормоны – салицилаты и стриголактоны.

Брассиностероиды – группа природных регуляторов роста растений, производные ненасыщенных оксистероидов с лактонной группой в кольце В. Ускоряют рост растений, однако иным способом, чем ауксины или гиббереллины, усиливают реакцию геотропизма, способствуют дифференциации ксилемы, повышают жизнеспособность пыльцы, задерживают старение листьев у ряда растений, регулируют угол наклона листьев, повышают устойчивость растений к стрессу. Наиболее известным представителем является брассинолид, выделенный в 1979 г. Дж. Митчелом и др. из пыльцы рапса (*Brassica napus*, отсюда название). Брассиностероиды содержатся в микроколичествах во всех органах высших и низших растений, наибольшие концентрации отмечены в пыльце. Синтезируются из широко распространенного в растениях тетрациклического тритерпена кампестерола. В последние годы получены

мутанты арабидопсиса и гороха, у которых нарушен синтез брассиностероидов или чувствительность к ним. У этих мутантов снижены рост и жизнеспособность пыльцы, изменена морфология листьев и реакция на свет. Благодаря мутантам было установлено, что брассиностероиды индуцируют экспрессию генов ксилотрансфераз-эндотрансглюкозилаз – ферментов, перестраивающих полисахаридные полимеры клеточных стенок так, что последняя временно размягчается, и благодаря этому клетки растут. Другим известным биохимическим эффектом брассиностероидов является стимуляция биосинтеза фитогормона этилена.

Жасмоновая кислота – природный регулятор роста растений ингибиторного типа, производное жирных кислот. Тормозит прорастание семян, способствует старению листьев и формированию клубней, стимулирует синтез некоторых защитных ферментов, а также специфических белков при развитии семян. Обнаруживается практически во всех органах растений, у разных видов, хотя получены мутанты (арабидопсиса), не чувствительные к жасмоновой кислоте. По спектру действия сходна, хотя и не полностью, с абсцизовой кислотой. В растениях активная жасмоновая кислота нередко выявляется в виде метилового эфира. Метилвый эфир жасмоновой кислоты – летучее соединение с характерным запахом некоторых цветов и фруктов (жасмина и др., отсюда название), используется в парфюмерной промышленности. Биосинтез жасмоновой кислоты происходит при распаде мембранных липидов с освобождением линоленовой кислоты. Последняя подвергается ряду ферментативных превращений, включающих окисление, циклизацию и сокращение длины углеводородной цепочки. При атаке фитопатогенов или воздействии ультрафиолета на растения жасмоновая кислота оказывает защитное действие, что открывает перспективы ее практического использования.

1.2. Зависимость гормональной активности от химического строения молекул

Действие фитогормонов на растение весьма поливалентно. Все они влияют на рост и деление клеток, процессы старения и адаптации, транспорт веществ, дыхание, синтез нуклеиновых кислот и белков и многие другие процессы. В принципе, любая клетка может синтезировать гормоны, однако важна концентрация в каждой клетке активной формы фитогормона. Активная концентрация фитогормона складывается из четырех процессов:

- 1) синтеза гормона;
- 2) транспорта и скорости поступления в клетку и выхода из неё;
- 3) перехода в неактивную (конъюгированную) форму;
- 4) катаболизма клетки.

Кроме того, у каждой группы фитогормонов имеются и свои специфические особенности, которые обусловлены их химическим строением.

Ауксины стали известны раньше других растительных гормонов ещё в начале XX ст. и сильно отличаются от остальных гормонов. Главный природный ауксин ИУК достаточно просто устроен, содержит индольную и карбоксильную группы, при этом структурной особенностью, объясняющей его активность, является расстояние между четвертым атомом углерода

индола и карбоксильной группой, составляющее около 0,5 нм, которое приводит к возникновению частичных положительного и отрицательного зарядов на этих атомах.

В настоящее время природные ауксины могут быть разделены на две группы – это ауксины, содержащие систему колец индола, и ауксины без индольных колец.

Производными индола являются индолил-3-масляная (ИМК) и индолил-3-пропионовая (ИПК), несмотря на схожесть строения с ИУК проявляют меньшую активность, но являются более стабильными. В агротехнике их синтетические препараты широко применяются для укоренения микрочеренков *in vitro*.

Наряду с ауксинами индольной природы в растениях встречаются также ауксиноактивные соединения иной структуры, например, не очень распространенная фенилуксусная кислота с малой активностью.

В продажу с ауксиновой активностью поступают довольно активные и устойчивые в тканях растений синтетические препараты:

1) производные нафтилкарбоновых кислот – 1-нафтилуксусная кислота (НУК) и её калиевая соль, 2-нафтоксиуксусная кислота (НОУК), которые используются для корнеобразования, поддержания стабильного роста каллуса, регулирования плодоношения, однако для накопления их в тканях растения требуется большая дозировка;

2) хлорзамещенные феноксипроизводные – кислоты 2,4-дихлорфеноксиуксусная (2,4-Д), 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная (2,4,5-Т), которые чаще используются как избирательные гербициды и только в малых концентрациях 2,4-Д нашел применение при размножении *in vitro* для инициации роста каллуса.

Кроме свободной ИУК в тканях присутствуют и связанные её формы, которые делятся на два типа – низкомолекулярные (конъюгаты с глюкозой, миоинозитом, аспартатом, глутатаматом) и высокомолекулярные комплексы (ИУК-глюканы и ИУК-гликопротеины). Содержание связанной ИУК обычно на 1-2 порядка превышает количество свободного ауксина. Связанные формы служат для инактивации излишков ИУК, её запасаения и в ряде случаев для защиты при транспортировке.

Цитокинины природного происхождения по своей химической структуре являются производными аденина или аденозина, которые модифицированы по атому азота в 6-м положении шестичленного гетероцикла. В отличие от ауксинов, нет главного цитокинина, их несколько (рисунок 1.1).

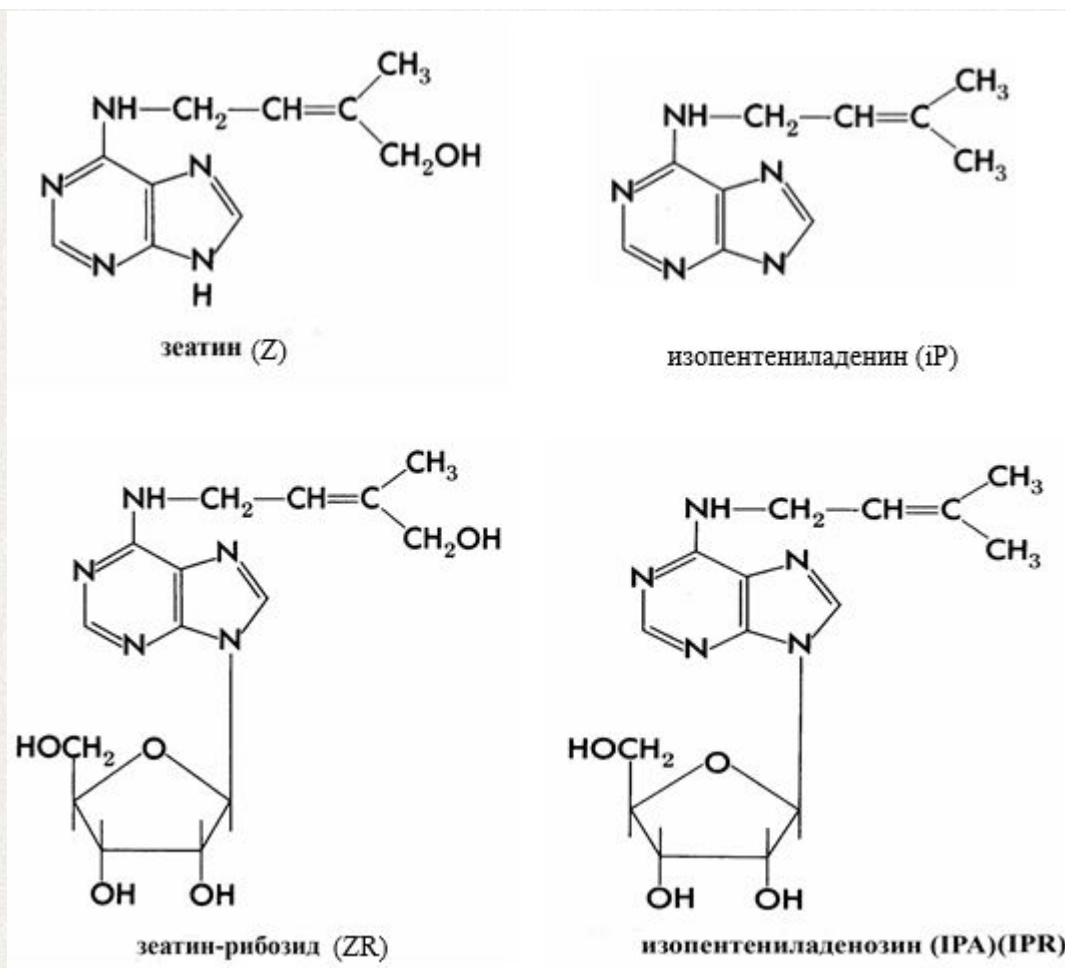


Рисунок 1.1 – Природные цитокинины

У большинства цитокининов в N6-положении к аденину присоединена короткая алифатическая цепь остатка изопентенила. Если эта цепь остается немодифицированной, цитокинины относят к группе изопентенильных (цитокинины iP-типа) – это изопентениладенин (iP). Если алифатическая цепь по концевому атому углерода будет гидроксильной, то такие соединения получили название зеатинов (цитокинины Z-типа). Отсутствие гидроксильной группы в изопентениладенине делает его более устойчивым к переходу в конъюгаты, однако менее активным по сравнению с транс-зеатином.

Зеатин, наиболее известный из цитокининов, может быть представлен в двух формах – цис- и транс-, которые взаимно превращаются друг в друга под действием фермента зеатинизомеразы. В молекуле транс-зеатина гидроксил направлен в сторону от аденинового гетероцикла. У цис-зеатина концевой гидроксил, наоборот, сближен с адениновым ядром, причем возможно образование водородной связи между водородом OH-группы и атомом азота в 1-м положении аденинового гетероцикла. Более высокой биологической активностью характеризуется транс-зеатин, однако и цис-зеатин может выполнять определенную физиологическую роль.

Цитокинины в клетке присутствуют в свободной (Z и iP) и связанной формах (риботиды и рибозиды, N7- и N9-гликозиды, а также гликозиды по гидроксильной группе изопентенильного фрагмента). Среди рибозидов выделяют зеатин-рибозид (ZR) и изопентениладенозин (IPA) или изопентенилрибозид (IPR). Биологическая активность природных цитокининов усиливается в ряду изопентениладенин < зеатин < зеатин-рибозид < изопентениладенозин и его варианты.

Цитокинины в клетке могут быть инактивированы путем конъюгации с сахарами или путем окисления с удалением пренилового фрагмента

(изопреноидной цепи).

Цитокинины и их аналоги могут быть получены путем относительно несложного химического синтеза; поэтому известно множество разнообразных синтетических цитокининов с различной степенью активности. На практике чаще всего применяют сравнительно легко синтезируемые и устойчивые цитокинины, такие как кинетин, бензиладенин (ВА) и/или изопентениладенин. Небольшим цитокининоподобным действием характеризуется дифенилмочевина, молекула которой не содержит адениновой системы колец. Однако её производное тидиазурон (TZ) представляет собой высокоактивное соединение, которое в низких концентрациях обладает выраженным цитокининовым эффектом: может стимулировать деление клеток и дифференциацию каллюса, образование почек, может способствовать фотосинтезу и ускорять эффективный перенос продуктов фотосинтеза к плодам, может замедлять старение листьев и др.

В высокой концентрации оказывает апоптическое действие, что нашло применение для дефолиации хлопчатника и существенно облегчило механический сбор хлопка. Так после поглощения листьями хлопчатника он может способствовать естественному разделению черешка и стебля и раннему опадению листьев.

Гиббереллины представляют собой дитерпеновые карбоновые кислоты, молекулы которых содержат четыре изопреновых остатка, образующих энт-гиббереллановый скелет – А (С6), В (С5), С (С6) и D (С5) кольца (рисунок 1.2).

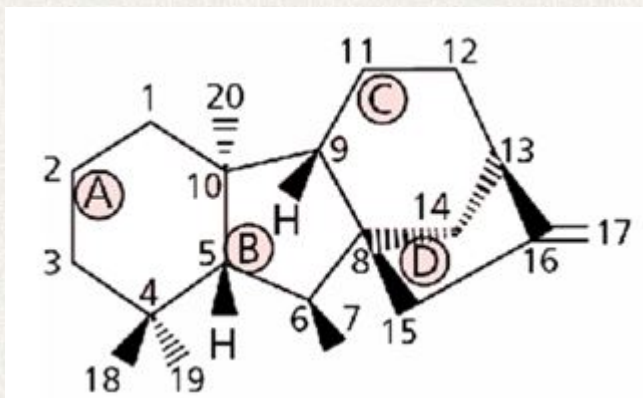


Рисунок 1.2 – Тетрациклический остов гиббереллинов (Дитченко, 2014)

В отличие от ауксинов, критерием отнесения вещества к группе гиббереллинов является соответствие определенной химической структуре, поэтому их принято обозначать как ГК (гибберелловая кислота) с индексом, обозначающим порядок открытия и идентификации, но не положение в метаболических путях.

По количеству углеродных атомов в молекуле гиббереллины разделяются на две группы: С20-гиббереллины и редуцированные С19-гиббереллины. Первые являются биогенетическими предшественниками более активных вторых. В свою очередь, С19- и С20-гиббереллины могут быть представлены моно-, ди- и трикарбоновыми кислотами. Основными вариациями в структуре гиббереллинов также являются наличие или отсутствие ненасыщенной связи в кольце А, число и расположение гидроксильных групп.

Среди обширного класса гиббереллинов только небольшое количество, такие как ГК1, ГК3, ГК4 и ГК7, обладают выраженной

биологической активностью. К функциональным группам, которые делают гиббереллины активными, относятся:

- 1) лактонное кольцо, образованное внутримолекулярной реакцией между карбоксильной и гидроксильной группами в положении 19→10.
- 2) гидроксил по третьему положению,
- 3) карбоксил по шестому положению.

Присутствие в молекуле всех указанных функциональных групп дает максимум активности гиббереллину, если какой-то из них нет, активность снижается. У разных растений могут быть разные гиббереллины, они могут работать по разным механизмам, один будет регулировать цветение у короткодневных растений, другие – сильно удлинять рост, растяжение, многие будут неактивны (неактивные предшественники).

Возможными путями инактивации гиббереллинов являются:

- 1) гидроксирование по второму, а не по третьему положению;
- 2) эпоксидирование;
- 3) метилирование;
- 4) образования конъюгатов с глюкозой – ГА-глюкозильных эфиров.

Этилен – особый газообразный фитогормон, молекулы которого просто устроены (C_2H_4), поэтому бессмысленно искать зависимость строения и биологической активности. Однако несмотря на то, что гормон – один, предшественник тоже один (метионин) и механизм биосинтеза один, проявление его активности будет зависеть от концентрации, вариантов регуляции которой может быть много из-за участия различных ферментов. В итоге количество образовавшегося этилена напрямую зависит от экспрессии генов ферментов его биосинтеза.

Главным ферментом, лимитирующим синтез этилена, является АЦК-синтаза, которая превращает S-аденозил-метионин в АЦК. АЦК-синтаза является индуцибельным ферментом и не синтезируется в клетках постоянно. Индукторами экспрессии генов, отвечающих за ее синтез, являются различные стрессовые воздействия (механическое повреждение, резкие колебания температуры, засуха, анаэробия, сигналы инфекции), а также гормональные сигналы (ауксин, брассиностероиды и сам этилен). Синтез АЦК-синтазы идет до тех пор, пока присутствует индуктор. В геноме растений существует большое семейство генов АЦК-синтазы, которые различаются по своей регуляции: одни включаются на разных стадиях нормального развития растений, другие – при поранении, третьи – при действии патогена и т.д. Это позволяет растению обеспечить многофакторную систему регуляции интенсивности биосинтеза этилена.

Следует отметить, что у растения контроль синтеза этилена происходит не только на уровне образования ключевого фермента его биосинтеза, но и через обеспечение стабильности АЦК-белков. Синтезированные молекулы АЦК-белков быстро разрушаются (период их полураспада составляет 20-30 мин.), поэтому основным путем их стабилизации является фосфорилирование по консервативным остаткам серина в С-концевых доменах, которое делает невозможным присоединение убиквитин-лигазы. Фосфорилирование АЦК-белков находится под контролем цитокинина.

Абсцизовая кислота синтезируется в листьях, корневом чехлике всех покрытосеменных и голосеменных растений, а также у папоротников, хвощей и мхов. Абсцизовая кислота относится к ряду сесквитерпенов

(C15), родственному монотерпенам и дитерпенам (включая гибберелловую кислоту) (рисунок 1.3).

В молекуле АБК присутствует один асимметричный атом углерода в кольце (1'), и поэтому молекула проявляет оптическую изомерию. Она может существовать в двух стереоизомерных (энантиомерных) формах: в форме (+), или правовращающей, и в форме (–), или левовращающей. Синтетическая АБК представляет собой рацемическую смесь их равных количеств. Изучение биологической активности рацемата показало, что ингибирующая активность право- (+) и левовращающей (–) форм одинакова, однако в растительных тканях присутствует преимущественно (+) АБК.

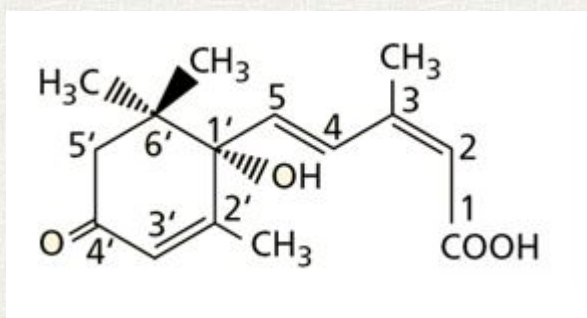


Рисунок 1.3 – Абсцизовая кислота (Дитченко, 2014)

Абсцизовая кислота проявляет не только оптическую, но и геометрическую изомерию: она может существовать в виде 2-*транс*, 4-*транс* и 2-*цис*, 4-*транс*- изомеров по двойной связи боковой цепи. Природная форма абсцизовой кислоты имеет 2-*цис*, 4-*транс*-конфигурацию боковой цепи, и ее называют просто абсцизовой кислотой, а 2-*транс*, 4-*транс*-изомер называют 2-*транс*- абсцизовой кислотой. Под действием видимого и ультрафиолетового света природная форма медленно, без участия ферментов изомеризуется в биологически малоактивную 2-*транс*-форму. Обратного перехода не обнаружено.

В растениях найдена связанная форма АБК – сложный эфир абсцизовой кислоты и D-глюкозы (абсцизил-β-D-глюкопиранозид). Он обладает вдвое меньшей биологической активностью, чем АБК.

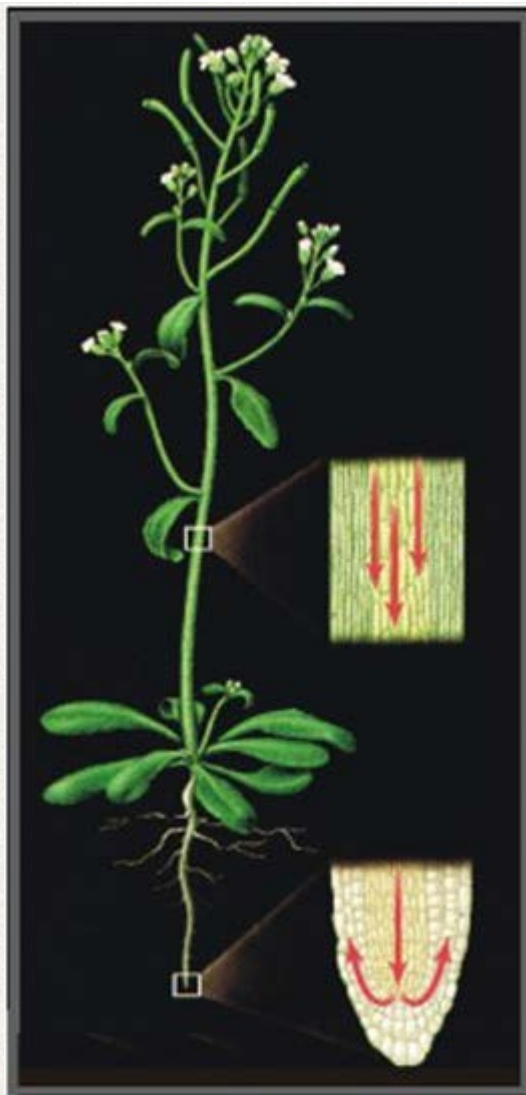


Рисунок 2.1 – Основные направления полярного транспорта ИУК в стебле и корне (Лутова, 2010)

Полярный транспорт ауксинов обеспечивается специальными трансмембранными белками-переносчиками, расположенными на разных полюсах клетки. Приток из апопласта в клетку молекулы ИУК (IAAH) в протонированной форме происходит по градиенту концентраций через influx-канал, представляющий собой белковый продукт гена AUX1 (рисунок 2.2).

ЛЕКЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ

Тема 2. ФИТОГОРМОНАЛЬНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ

2.1. Полярный транспорт ауксинов. Рецепция и передача сигнала ауксинов. Гены первичного ответа на ауксины. Функции ауксинов в развитии растений.

Ауксины преимущественно транспортируются по живым клеткам паренхимы проводящих пучков растения полярно: базипетально в нисходящем направлении от апекса побега к его основанию и далее в корень, где происходит смена направления его транспорта на 180° – акропетально от кончика корня вверх по кортексу до зоны образования боковых корней (рисунок 2.1).

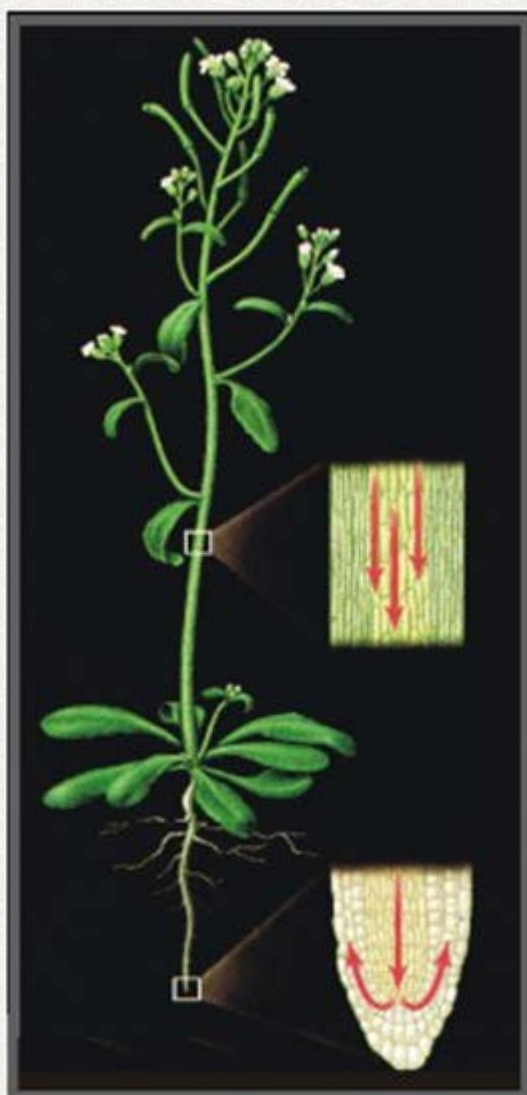


Рисунок 2.1 – Основные направления полярного транспорта ИУК в стебле и корне (Лутова, 2010)

Полярный транспорт ауксинов обеспечивается специальными трансмембранными белками-переносчиками, расположенными на разных полюсах клетки. Приток из апопласта в клетку молекулы ИУК (IAAH) в протонированной форме происходит по градиенту концентраций через influx-канал, представляющий собой белковый продукт гена AUX1 (рисунок 2.2).

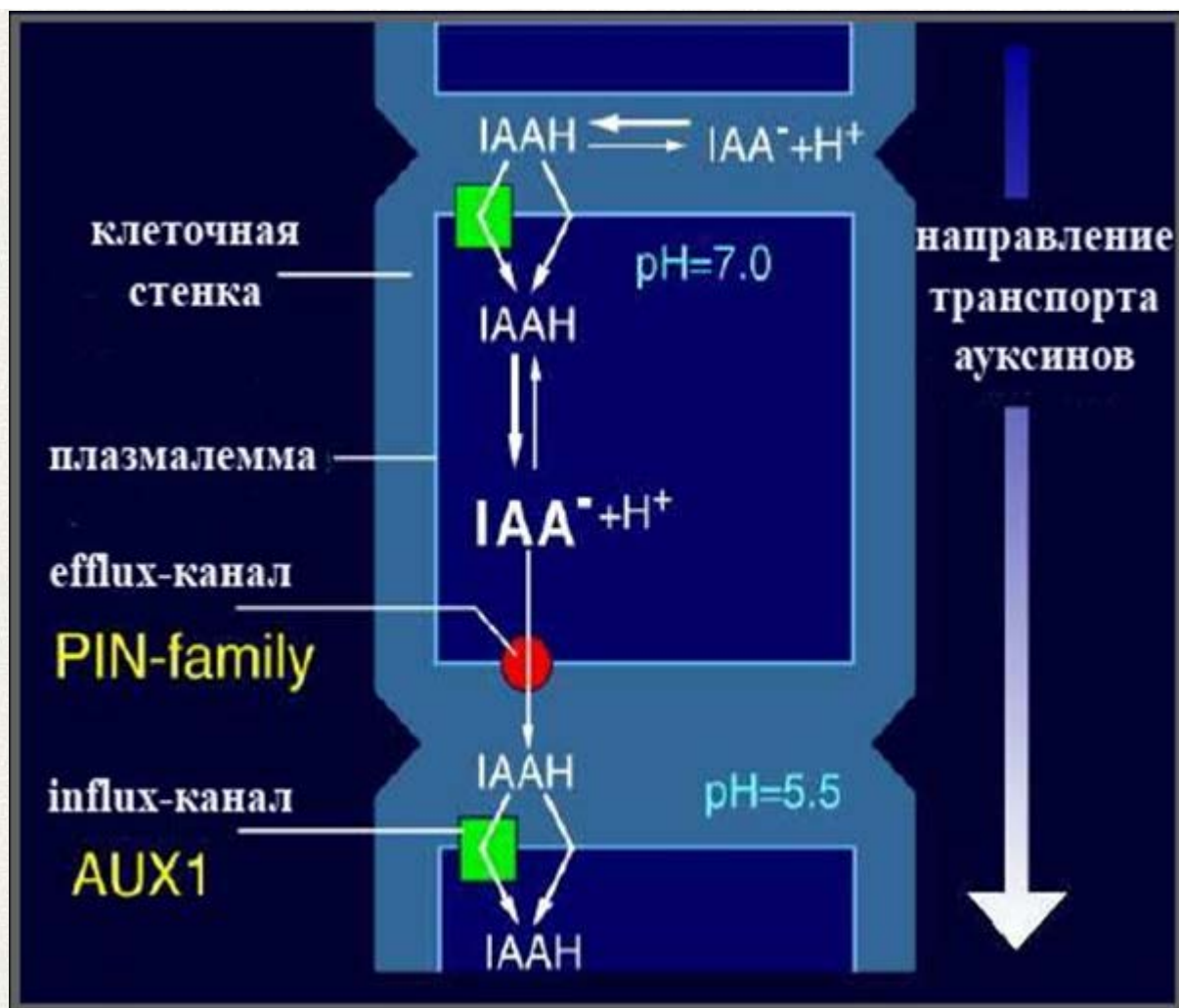


Рисунок 2.2 – Хемиосмотический механизм входа протонированной формы ИУК в клетку (Лутова 2010)

В цитоплазме клетки при $pH \geq 7,0$ ИУК диссоциирует и становится отрицательно заряженным ионом ($IAAH \rightarrow IAA^- + H^+$), отток которого происходит с затратой энергии через efflux-канал, являющийся белковым продуктом гена семейства PIN. Предполагают, что белковые насосы, работающие с ИУК, связаны с цитоскелетом и при изменении внешних факторов, например, освещения, могут быстро передвигаться на теневую сторону. Это предположение основано на том, что при экзогенном ингибировании сборки актиновых филаментов блокируется полярный транспорт ауксинов. Показано, что нарушается также транспорт ауксина веществами (2,3,5-трийодбензойной кислотой (ТІВА), N-1-нафтилфталамовой кислотой (NPA)), связывающимися с его трансмембранными переносчиками. В присутствии ингибиторов полярного транспорта ауксина наблюдаются аномальные разрастания частей растения и изменение общего габитуса.

У растительной клетки обнаружено два рецептора связывания ИУК. Это самый первый найденный ABP1 (Auxin Binding Protein 1) или ауксин-связывающий белок 1 с молекулярной массой 22 кДа, который располагается преимущественно в мембране ЭПР (90 %) и только 10 % – в плазмалемме.

Связывание рецептором ABP1 ИУК приводит к стимуляции работы белков ионного транспорта и активации экспрессии генов раннего ответа, в частности, активируется транскрипция генов протонной помпы (H-АТФазы) и генов, кодирующих белки ионных каналов, что приводит к

увеличению их количества в плазмалемме (рисунок 2.3).

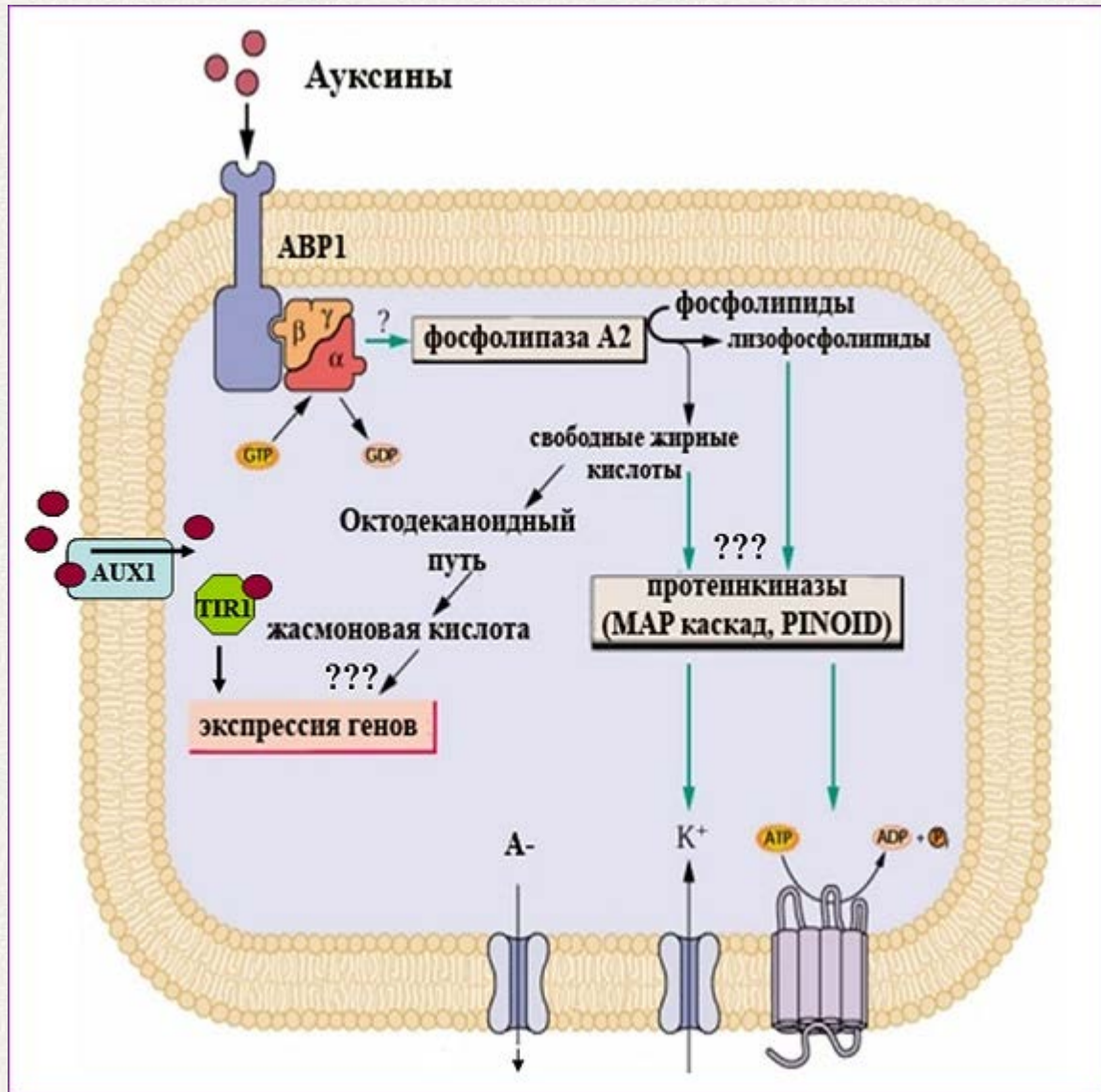


Рисунок 2.3 – Рецепция и передача сигнала при ответе на ауксины (Лутова 2010)

Белок AUX1 транспортирует ауксин в клетку, где он связывается рецептором ABP1 на мембране ЭПР или на плазмалемме. Усиление сигнала, рецептируемого ABP1, происходит с помощью G-белков и вторичных мессенджеров. Путь передачи сигнала при ответе на ауксины может включать следующие звенья: α -субъединица G-белка \rightarrow фосфолипаза A2 \rightarrow лизофосфолипиды и свободные жирные кислоты \rightarrow протеинкиназы, влияющие на полярный транспорт ауксинов.

Ранний регистрируемый наиболее известный физиологический ответ на ауксин, запускаемый белком ABP1, – это активация протонных каналов и как следствие эффект «кислого роста», который связан с подкислением клеточной стенки (выходом протонов), вызывающим разрывы в структуре её целлюлозных и пектиновых полимеров, что приводит к её размягчению и растяжению под воздействием внутриклеточного давления (рисунок 2.4).

Через 1-2 минуты после связывания ауксина с ABP1 и включения системы вторичных мессенджеров регистрируется вход ионов Ca^{2+} и K^{+} в клетку, активация анионных каналов и выход анионов из клетки, а через 5-7 минут активируется H^{+} -помпа и наблюдается выброс большого количества протонов. Выкачивает протоны протонная помпа за счет гидролиза АТФ. Выход H^{+} приводит к растяжению клеточной стенки, которое длится около 30 минут.

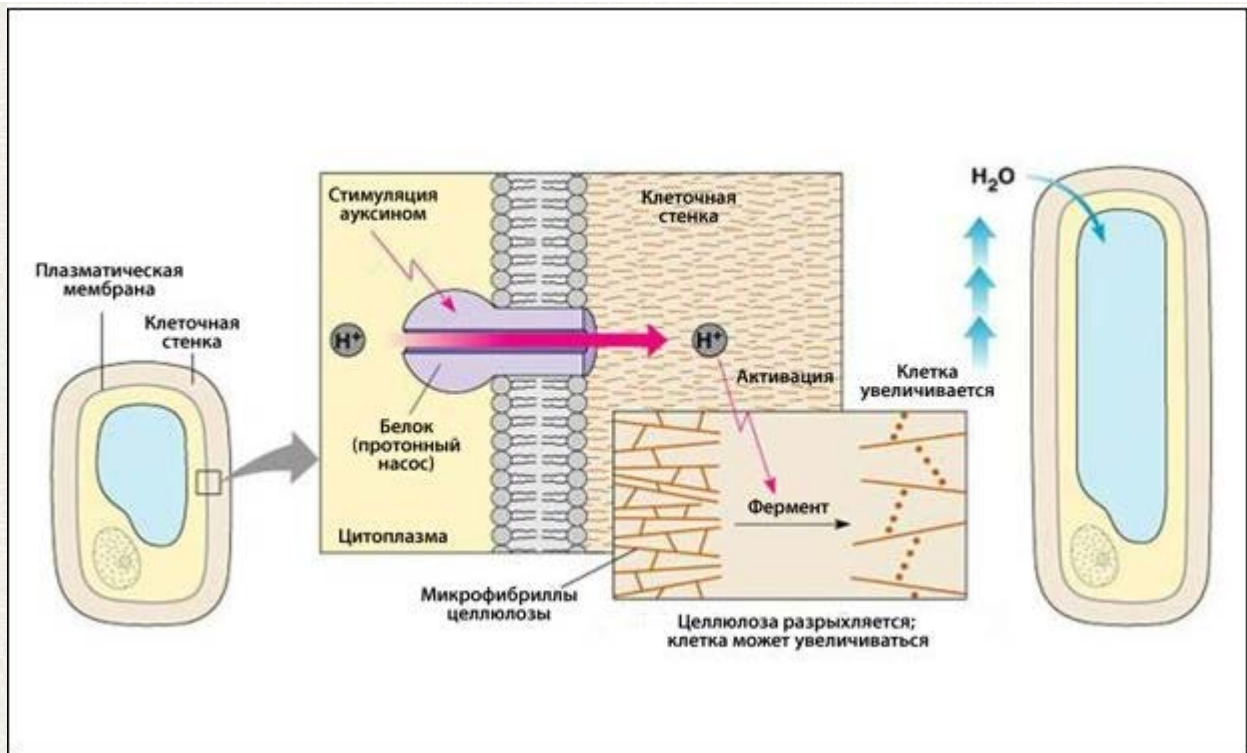


Рисунок 2.4 – Схема ауксин-зависимого роста клеток растяжением (<https://bioword.ru/K/acidgrowththeory.htm>)

Второй рецептор – это многокомпонентная внутриядерная система, целью которой является снятие ингибирования генов ауксинового ответа, т. е. запускает поздний ответ. При связывании ауксина с белком TIR1 (Transport Inhibitor Response 1) он начинает работать в составе убиквитин-лигазного комплекса SCF (Skp1-Cullin-F-box), его мишенью является ингибитор транскрипции генов ауксина Aux/IAA (Auxin insensitive/ Indole acetic acid insensitive), на который навешивает убиквитин и отправляет в протеасому для деградации. Таким образом рецепция ИУК снимает ингибирование генов генома, с которыми может связываться белок ARF (Auxin Response Factor).

Белки ARF и Aux/IAA являются антагонистами и выполняют функции соответственно активаторов и репрессоров транскрипции ауксин-регулируемых генов.

Гены первичного ответа на ауксины содержат в своих промоторах последовательности AuxRE и являются прямыми мишенями транскрипционных факторов ARF. Это могут быть гены, контролирующие ауксиновый сигналинг и метаболизм ауксинов, гены клеточного цикла, гены органогенеза и другие. В настоящее время выявлено около 50 ауксинрегулируемых генов, экспрессия которых активируется (или подавляется) при обработке ИУК.

Функции ауксинов на уровне клетки:

- 1) контроль клеточного цикла (S фаза, переход G2–M);
- 2) стимуляция активности ионных каналов;
- 3) стимуляция роста клетки растяжением;
- 4) стимуляция дифференцировки специфических типов клеток сосудов, корневых волосков.

Функции ауксинов на уровне организма:

- 1) определение полярности развития;
- 2) стимуляция развития боковых и придаточных корней, латеральных

органов побега;

- 3) апикальное доминирование;
- 4) гравитропизм и фототропизм.

2.2. Транспорт цитокининов. Рецепция и передача сигнала цитокининов. Гены первичного ответа на цитокинины. Функции цитокининов в развитии растений.

Транспорт цитокининов в вегетирующих растениях происходит из апикальной меристемы корня в акропетальном направлении с ксилемным током пассивно и неполярно. При этом основной транспортной формой цитокининов является зеатин-рибозид (ZR). Также свободные цитокинины и гликозиды могут транспортироваться по флоэме в обоих направлениях.

Транспорт цитокининов между клетками растения осуществляют две группы белков:

1) пурипермеазы (PUP), которые транспортируют в клетку и из неё свободные цитокинины (Z, iP), а также аденин;

2) белки ENT (Equilibrative Nucleoside Transporters), т. е. равновесные транспортеры нуклеозидов, которые переносят цитокинин-рибозиды (ZR, IPR) (рисунок 2.4).

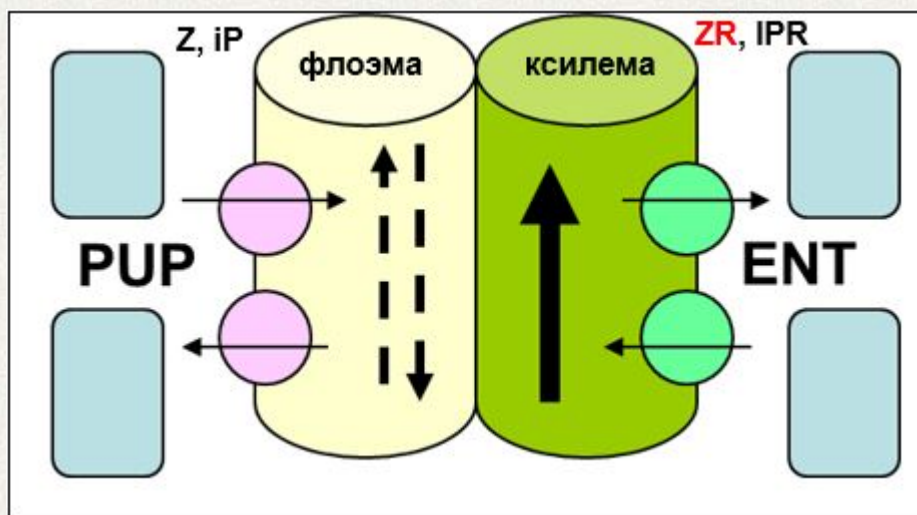


Рисунок 2.5 – Схема транспорта цитокининов по проводящим тканям растений и участия белков в их межклеточном переносе (Лутова 2010))

В геноме арабидопсиса обнаружено три гена пурипермеаз (*AtPUP1*, *AtPUP2* и *AtPUP3*), которые различаются по пространственному характеру экспрессии. Белковый продукт гена *AtPUP2* является основным в надземной части растений и осуществляет обмен свободными цитокининами между проводящей системой и окружающими тканями. Белок PUP1 выводит из гидатод листа цитокинины в окружающие ткани, тем самым препятствует их потере при выделении влаги. Белок PUP3 обнаружен только в пыльцевых зернах. Белки ENT функционируют в ксилеме стебля и корня, осуществляют межклеточный транспорт не только цитокинин-рибозидов, но и других нуклеозидов.

Рецепторы цитокининов – плазмалемные гистидин-киназы АНК (*Arabidopsis Histidine Kinase*) (АНК2, АНК3 и АНК4) относятся к группе сенсорных His-киназ, широко распространенных у прокариот, и имеют сложную трехдоменную структуру: лиганд-связывающий цитокинин трансмембранный домен CHASE (Cyclase His-Kinase-Associated Extracellular) на N-конце и способный к димеризации; гистидин-киназный домен, осуществляющий автофосфорилирование по остатку гистидина;

Receiver домен воспринимающий и переносящий фосфатную группу на белок АНР.

Основные компоненты пути передачи сигнала в клетке арабидопсиса при ответе на цитокинины представлены на рисунке 2.5 и включают:

- 1) рецепторы – гибридные сенсорные гистидин-киназы (семейство АНК);
- 2) гистидин-фосфопереносящие белки (семейство АНР);
- 3) транскрипционные факторы ARR-B;
- 4) репрессоры ответа на цитокинин ARR-A (гомологи ARR-B).

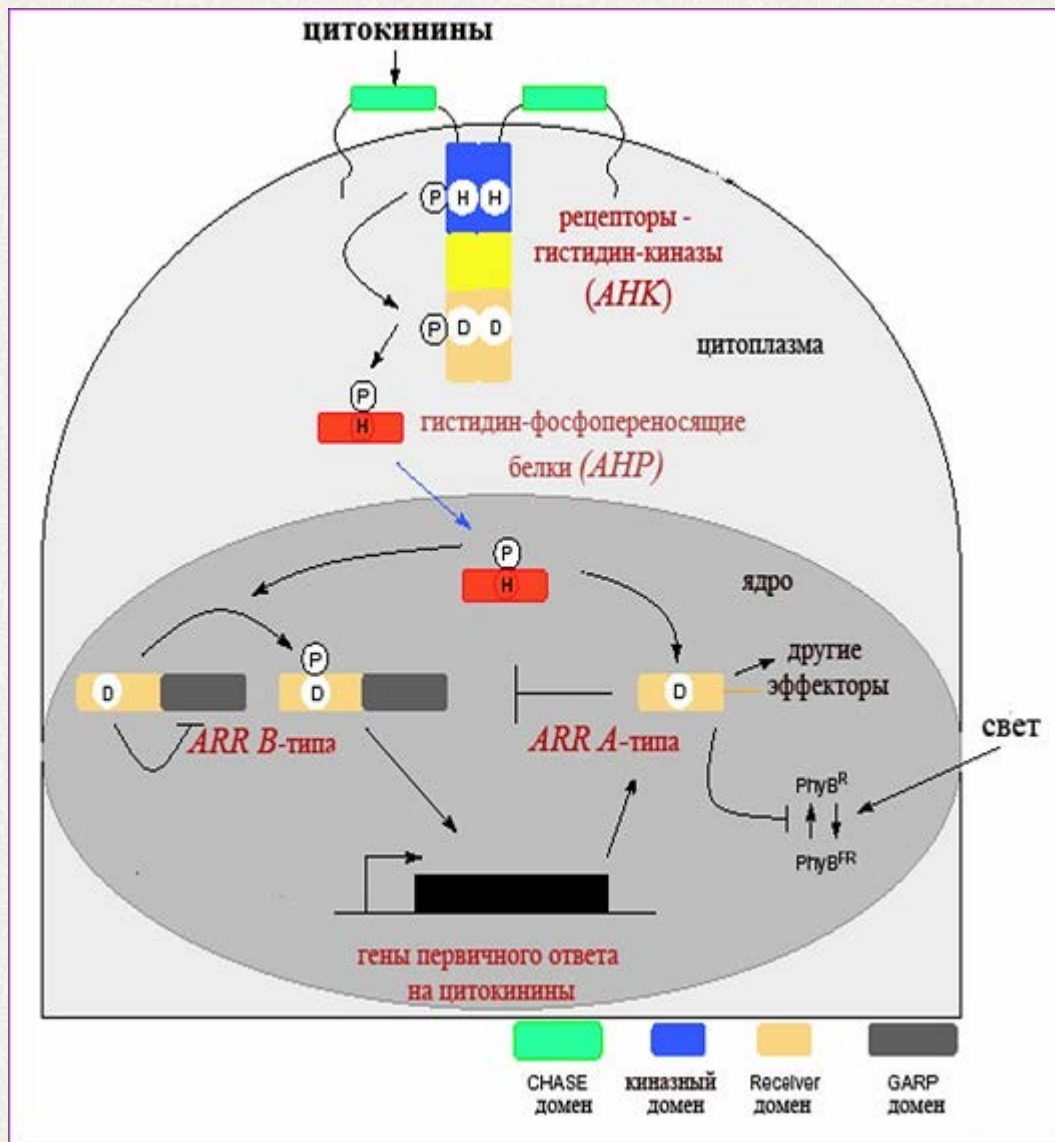


Рисунок 2.5 – Схема организации пути передачи сигнала при ответе на цитокинины (Лутова 2010)

Рецепторы к цитокининам АНК работают по принципу «фосфореле», т. е., будучи активированными, передают сигнал фосфопереносящему белку АНР (Arabidopsis Histidine Phosphotransfer), который обладая небольшим размером легко перемещается из цитоплазмы в ядро. АНР фосфорилирует и активирует транскрипционный фактор ARR-B (Arabidopsis Response Regulator type-B). В фосфорилированном состоянии транскрипционный фактор ARR B-типа связывается с промоторами цитокинин-чувствительных генов первичного ответа и активирует их экспрессию. Это гены, контролирующие метаболизм и передачу сигнала различных фитогормонов, гены, участвующие в световом сигналинге, гены некоторых хлоропластных белков, гены, контролирующие клеточный цикл,

гены, контролирующие транспорт и метаболизм сахаров и неорганических солей.

Среди активируемых транскрипционным фактором ARR-B генами «раннего» ответа являются ARR-A, экспрессия которых многократно усиливается при повышении концентрации цитокининов. Белки ARR A-типа связываются с различными функциональными белками, модулируя их активность, а также негативными регуляторами цитокининового ответа, поскольку являются репрессорами транскрипционного фактора ARR B-типа. Экспериментально показано, что сверхэкспрессия генов первичного ответа ARR-A у арабидопсиса вызывает снижение чувствительности к цитокининам. Мутации с потерей функции генов ARR-A не вызывают видимых фенотипических изменений, но у мутантов наблюдается повышенная чувствительность к цитокининам. Сверхэкспрессия генов ARR-B у трансгенных растений приводит к повышению чувствительности к цитокининам и появлению фенотипа, характерного для растений со сверхпродукцией цитокининов.

Функции цитокининов на уровне клетки:

- 1) контроль клеточного цикла (переход G1–S);
- 2) стимуляция развития хлоропластов;
- 3) стимуляция транспорта питательных веществ в клетку.

Функции цитокининов на уровне организма:

- 1) поддержание апикальной меристемы побега;
- 2) ингибирование апикальной меристемы корня;
- 3) снятие апикального доминирования
- 4) замедление старения листьев.

2.3. Рецепция и передача сигнала гиббереллинов. Гиббереллин-регулируемые гены. Функции гиббереллинов в развитии растений.

Гиббереллины, также как ауксины и цитокинины, имеют большее значение на начальных этапах онтогенеза растения, однако места их синтеза зависят от стадии развития растения. Так на стадии зародыша синтез гиббереллинов идет практически по всему зародышу, на стадии проростков – в стебле и coleoptиле, на стадии цветения – в пыльниках, но основным местом их синтеза у взрослого растения являются листья.

Транспорт гиббереллинов от места синтеза по растению идет пассивно во всех направлениях как по ксилеме, так и по флоэме на небольшие расстояния. Поскольку гиббереллины являются слабыми кислотами, то свободно проникают в клетку в виде анионов путем диффузии, поэтому на плазмалемме нет специальных рецепторов.

Рецептором активных форм гиббереллина является, по-видимому, один внутриклеточный ядерный белок GID1 (Gibberellin Insensitive Dwarf 1). Активированный рецептор GID1 взаимодействует с репрессорами передачи гиббереллинового сигнала – белками DELLA (рисунок 2.6).

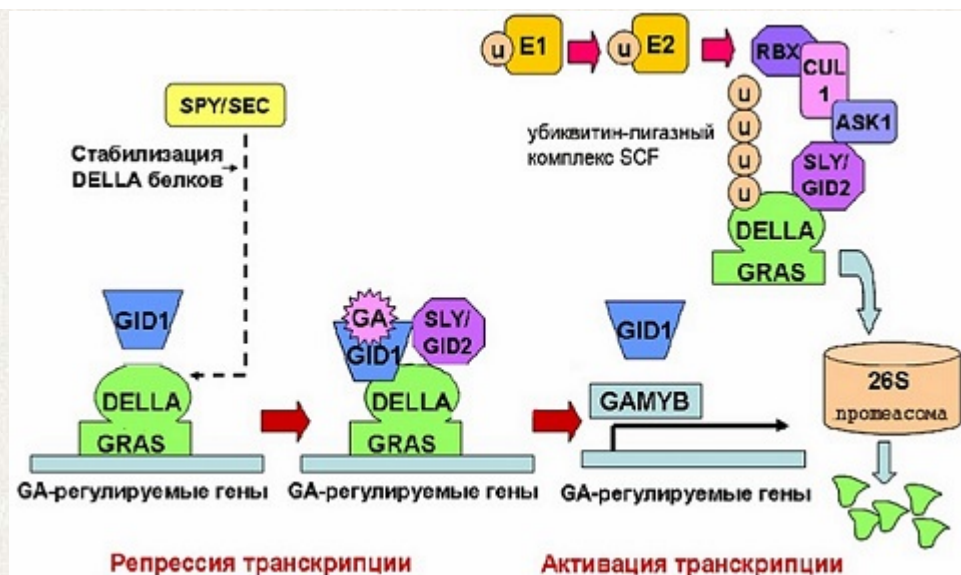


Рисунок 2.6 – Схема рецепции и передачи сигнала при ответе на гиббереллины (Лутова 2010)

Свое название DELLA-белки получили благодаря наличию на N-конце особой последовательности аминокислот (DELLA-домена), консервативной для всех высших растений, и отвечающей за связывание с активированным рецептором GID1. На C-конце DELLA-белков, соответственно, присутствует ДНК-связывающий GRAS-домен, который был назван по имени первых трех открытых GRAS-транскрипционных факторов GAI (GA Insensitive), RGA (Repressor of GA1-3) и SCR (SCARECROW) у *Arabidopsis thaliana*. Два из них, а именно GAI и RGA, являются DELLA-белками. Гены, кодирующие DELLA-белки, выявлены у всех изученных видов растений. Также установлено, что помимо репрессии GA-регулируемых генов, участвующих в развитии растения, DELLA-белки играют ключевую роль в обратной связи, которая имеет место в контроле биосинтеза и передаче сигнала гиббереллинов. Кроме того, одной из функций DELLA-белков является обеспечение интеграции действий гиббереллинов и других фитогормонов (ауксинов, АБК и этилена).

В результате взаимодействия рецепторного GID1-белка с DELLA-белком происходит изменение конформации последнего, что делает возможным присоединение к нему ключевого компонента убиквитин-лигазного комплекса SCF – F-бокс-содержащего белка SLY/GID2. Это взаимодействие стимулирует убиквитинирование DELLA-белков комплексом SCF^{SLY/GID2} с последующей их деградацией 26S-протеасомой. Путь оказывается свободным и к промоторам GA-регулируемых генов присоединяется гиббереллин-зависимый транскрипционный фактор GAMYB (GA MYeloBlastosis), содержащий консервативный ДНК-связывающий домен MYB, и совместно с другими активаторами запускает их экспрессию.

Таким образом, путь передачи сигнала при ответе на гиббереллины включает в себя четыре основных компонента:

- 1) рецептор GID1;
- 2) компоненты убиквитин-лигазного комплекса SCF^{SLY/GID2};
- 3) DELLA-белки – репрессоры ответа на гиббереллин, относящиеся к семейству транскрипционных факторов GRAS;
- 4) гиббереллин-зависимые транскрипционные факторы GAMYB из MYB-семейства.

В геноме растений обнаружены сотни гиббереллин-регулируемых генов через деградацию DELLA-белков и присоединение транскрипционных факторов GAMYB, которые могут быть разделены на следующие группы:

- 1) гены, участвующие в контроле различных этапов онтогенеза, в частности прорастания (гены α -амилаз) и цветения (гены *LEAFY* или *LYF*);
- 2) гены, контролирующие метаболизм гиббереллинов (*GA20ox*, *GA3ox*, *GA2ox*);
- 3) гены, контролирующие этапы сигналинга гиббереллинов (гены *GID1*, гены убиквитин-конъюгирующих ферментов E1 и убиквитин-лигаз E3, гены транскрипционных факторов *GAMYB*);
- 4) гены, контролирующие метаболизм и сигналинг других гормонов.

Функции гиббереллинов на уровне организма:

- 1) стимуляция вегетативного развития (прорастание семян, рост стебля в длину);
- 2) стимуляция генеративного развития (переход к цветению).

2.4. Рецепция и передача сигнала этилена. Этилен-зависимые транскрипционные факторы. Функции этилена в развитии растений.

Этилен является единственным газообразным гормоном растений, поэтому его транспорт не требует специализированных механизмов – его молекулы свободно диффундируют из клетки в клетку обеспечивая перераспределение концентрации фитогормона, а также возможность его действия на значительном удалении от места синтеза. Кроме того, выделяясь из растения в окружающую среду, этилен может обеспечивать передачу сигналов между растениями.

С другой стороны, дистанционное действие этилена может быть достигнуто благодаря транспорту по сосудистым тканям при стрессе его предшественника – неактивной транспортной формы АЦК. Так при затоплении почвы включается этиленовая система защиты: синтезируемая в клетках корня АЦК в отсутствии кислорода транспортируется в надземные органы, где превращается в этилен. Этилен индуцирует в побегах эпинастию – изменение угла наклона черешка к стеблю, в результате которого листья опускаются вниз, уходят от прямого действия солнечных лучей. При этом листья меньше нагреваются и меньше испаряют воды.

В настоящее время установлена цепочка проведения этиленового сигнала в растительной клетке при изучении мутантов арабидопсиса с тройным ответом проростков на этилен (рисунок 2.7).

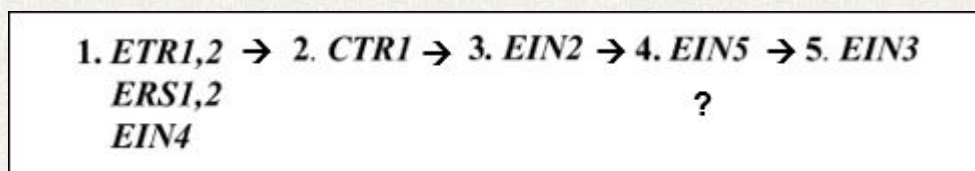


Рисунок 2.7 – Порядок действия генов в передаче сигнала при ответе на этилен (Лутова 2010)

Рецепторами этилена у арабидопсиса являются интегральные мембранные белки: ETR1 и ETR2 (Ethylene Receptor 1 и 2), ERS1 и ERS2 (Ethylene Response Sensor 1 и 2), EIN4 (Ethylene Insensitive 4), относящиеся к той же группе сенсорных His-киназ, как и у цитокинина АНК (рисунок 2.5). Локализованы рецепторы на мембранах ЭПР и аппарата Гольджи и связываются с проникшими путем диффузии в клетку молекулами этилена.

Рецепторы этилена, в отличие от прочих рецепторов фитогормонов,

являются негативными регуляторами этиленового ответа: в отсутствие этилена рецептор находится в активном состоянии, подавляя развитие ответа, тогда как связывание этилена инактивирует рецептор, разрешая ответ.

Рецептор этилена функционирует как димер, состоящий из двух трансмембранных белков, соединенных дисульфидными связями: сенсорного элемента — гистидин-киназы, способной к автофосфорилированию по консервативному остатку гистидина на С-конце, и регуляторного элемента, содержащего остаток аспарагиновой кислоты, на которую переносится фосфатная группа. Местом связывания гормона является N-терминальный участок этиленового рецептора. Кофактором этиленовых рецепторов является Cu^{2+} , который непосредственно взаимодействует с молекулами рецепторов и способствует связыванию этилена (рисунок 2.8). Связывание молекулы этилена и фосфорилирование является сигналом инактивации и деградации рецептора.

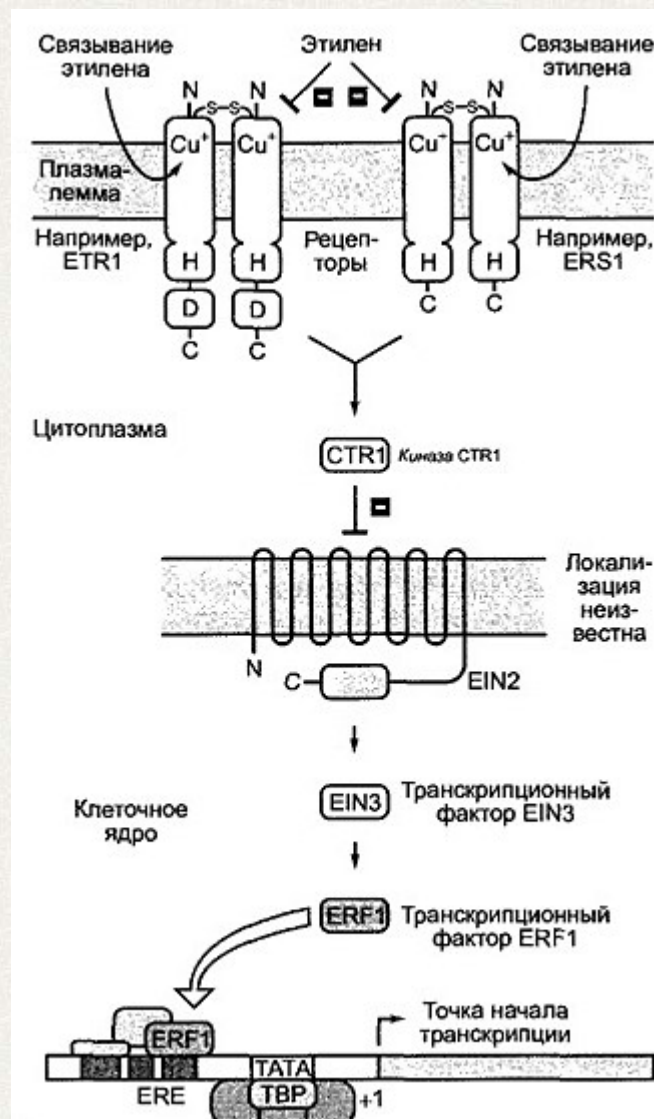


Рисунок 2.8 – Рецепция и передача сигнала при ответе на этилен

Таким образом, рецепция этилена связана с тремя особенностями:

- 1) ответ на этилен не связан с передачей фосфатных групп от рецептора к последующим компонентам сигнального пути;
- 2) рецепторы являются негативными регуляторами ответа;
- 3) рецепторы инактивируются и деградируют при связывании лиганда.

Передача сигнала от рецепторных тирозинкиназ к ядру клетки при отсутствии этилена может блокироваться серин-треониновой протеинкиназой CTR1, контролируемой геном CTR1 (*Constitutive Triple Response 1*). Этот белок локализован в ЭПС и запускает один из путей негативной регуляции ответа на этилен, являясь её следующим звеном. Белок CTR1 – активный репрессор, поскольку, взаимодействуя с рецепторным комплексом тирозинкиназы в отсутствие этилена, блокирует перевод этилен-зависимых транскрипционных факторов EIN3 в активное состояние и отправляет их для деградации в 26S-протеасому (рисунок 2.9), поэтому гены первичного ответа на этилен не включаются. Мутация по гену CTR1 приводит к морфологическим изменениям у арабидопсиса, которые могли бы возникнуть при постоянном включении этиленовой программы, проявляется т. н. конститутивный тройной эффект.

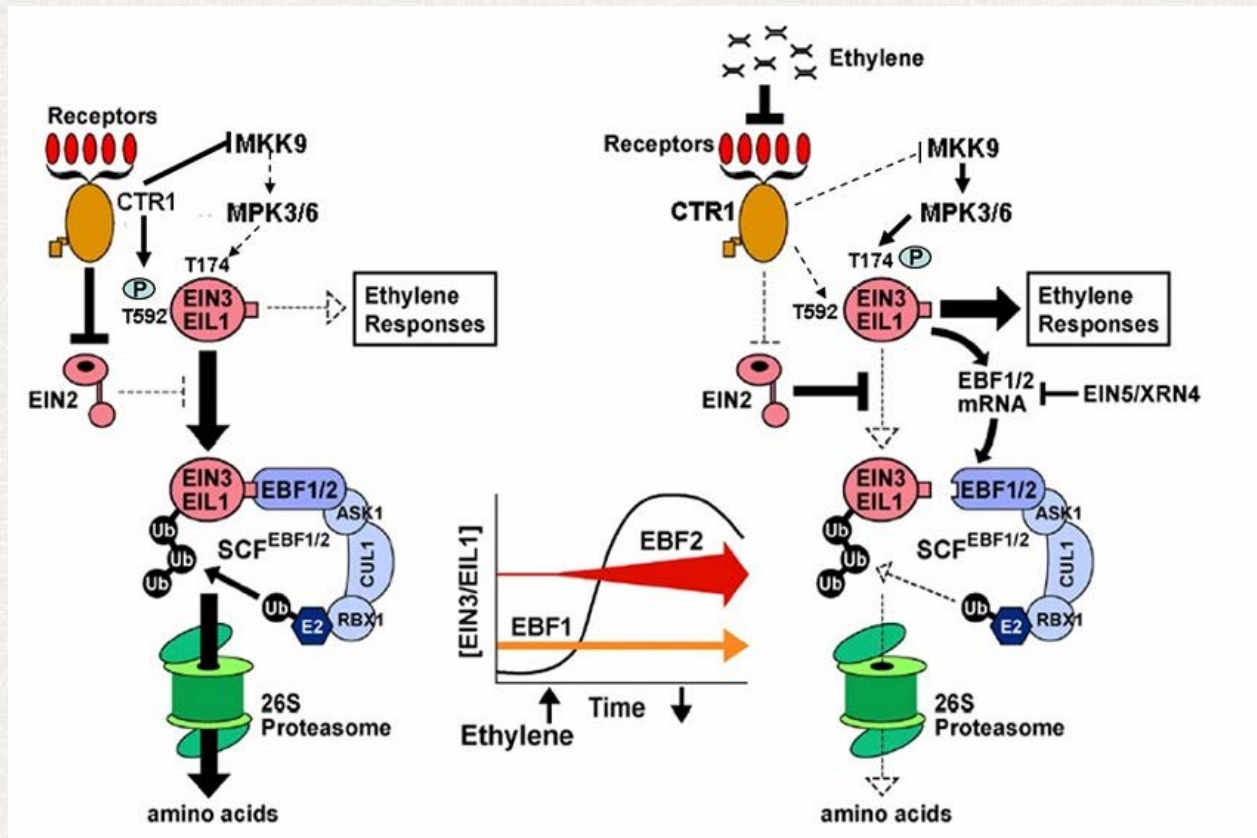


Рисунок 2.9 – Контроль стабильности транскрипционных факторов EIN3/EIL1 (Лутова 2010)

Мишенями CTR1-киназы кроме этилен-зависимых транскрипционных факторов EIN3 являются вышерасположенные компоненты сигнального пути – белки EIN2, которые осуществляют связь между протеинкиназой CTR1 и транскрипционными факторами EIN3 и выделенным по гомологии с ним ядерным белком EIL1 (EIN3-Like 1) (рисунок 2.7).

Установлен еще один ген в передаче сигнала при ответе на этилен у арабидопсиса – ген EIN5, продукт которого экзорибонуклеаза EIN5 участвует в деградации транскриптов генов *ERF1/2* и таким образом позитивно регулирует передачу этиленового сигнала. Мутация этого гена приводит к нечувствительности к этилену. Пока остается нерешенным вопрос о механизме контроля этого гена.

Следующим звеном пути передачи этиленового сигнала выступают транскрипционные факторы EIN3/EIL1 – короткоживущие белки (период полураспада 30 мин). Они являются позитивными регуляторами, поскольку

связывание этилена с рецепторами приводит к инактивации CTR1-киназы, а это способствует их стабилизации и накоплению, а также запуску экспрессии генов-мишеней (рисунок 2.9).

Генами первичного ответа на этилен являются гены, экспрессия которых напрямую активируется транскрипционными факторами EIN3/EIL1:

1) гены *ERF1* и *ERF2* (*Ethylene Response Factor 1*), кодирующие транскрипционный фактор, способный связываться со специфической последовательностью ERE (*Ethylene Response Element*) промоторов генов, участвующих в ответе на биологический стресс (поражение различными патогенами), а также на разные виды абиотических стрессов (высокую температуру, высыхание, поранение и др.) и контроле созревания плодов;

2) гены, участвующие в контроле старения и программируемой клеточной гибели;

3) гены *EBF1* и *EBF2* (*EIN3-Binding F-box*), кодирующие F-box-содержащие белки, посредством которых осуществляется протеасомная деградация транскрипционных факторов EIN3/EIL1.

Таким образом, относительно большое число этиленовых рецепторов позволяет расширить диапазон эффективных концентраций этилена и поддерживать сигнал более длительное время.

В силу негативной регуляции рецепторами ответа на этилен в результате деградации рецепторов происходит пролонгирование действия этилена. Для устранения избыточного количества фитогормона не существует специальных систем инактивации, газ выводится в окружающее пространство путем диффузии.

Функции этилена на уровне клетки:

- 1) контроль программируемой клеточной смерти (ПКС);
- 2) формирование вторичной клеточной оболочки;
- 3) стимулирование образования корневых волосков.

Функции этилена на уровне организма:

- 1) контроль развития проростка на ранних этапах (тройной ответ);
- 2) участие в защите растений от биотических и абиотических стрессов;
- 3) регуляция созревания плодов;
- 4) контроль сезонного опадения листьев, неопыленных цветков и созревших плодов;
- 5) контроль старения органов растения.

2.5. Рецепция и передача сигнала абсцизовой кислоты. Транскрипционные факторы-мишени сигнальной трансдукции абсцизовой кислоты. Функции абсцизовой кислоты в развитии растений.

Биосинтез АБК в растениях происходит в основном в молодых сосудистых пучках, а также в замыкающих клетках устьиц. В разных органах растения наблюдается как базипетальный, так и акропетальный транспорт АБК. Обнаружено ингибирование транспорта АБК анаэробиезом, разобщающими агентами, низкой температурой. Экзогенная АБК быстро проникает в ткани и свободно распространяется по растению во всех направлениях.

Несмотря на длительный период изучения, в настоящее время нет общей *схемы рецепции* и передачи сигнала АБК. Предположительно четыре независимых рецептора запускают независимые пути передачи сигнала для

реализации разных программ развития (рисунок 3.10):

1) FCA – ядерный РНК-связывающий белок, ингибитор экспрессии гена *FLC* (рецептора цветения), однако активность FCA как рецептора АБК до конца не подтверждена;

2) CHLH – хлоропластный рецептор АБК, локализованный в хлоропластах и участвующий в метаболизме хлорофилла и передаче сигналов от хлоропластов к ядру;

3) GPCR (G-Protein Coupled Receptors) – трансмембранные рецепторы АБК, ассоциированы с G-белками и локализованы в плазмалемме;

4) RCAR/PYR/PYL (Regulatory Components of ABA Receptor/ Pyrobactin Resistant/ Pyrobactin Resistant-Like) – цитозольные рецепторы АБК, относящиеся к одному из семейств белков-ингибиторов проитеифосфатаз.

Каждый из типов рецепторов ПБК индуцирует свой путь передачи сигнала, приводящий к активации разных групп транскрипционных факторов.

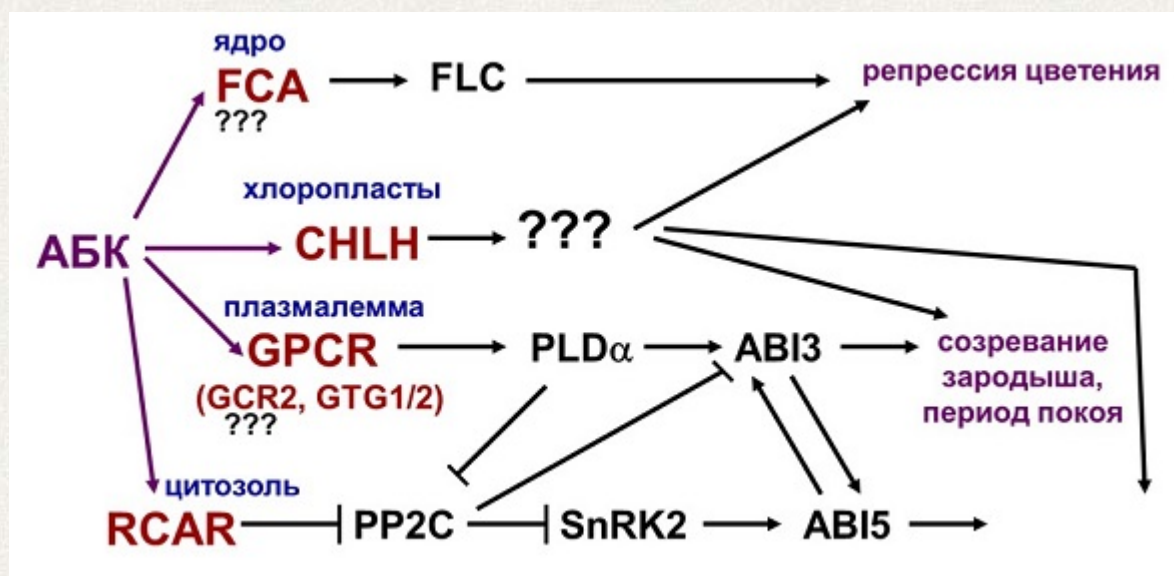


Рисунок 2.10 – Рецепция и передача сигнала АБК (Лутова 2010)

Разные группы транскрипционных факторов также взаимодействуют в контроле многих АБК-зависимых процессов. В частности, для контроля экспрессии генов, связанных с ответом на абиотический стресс, большое значение имеет взаимодействие транскрипционных факторов ABI4 и ABI5. Для контроля поздних этапов эмбриогенеза показано взаимодействие ABI3 и ABI5. В промоторах многих АБК-регулируемых генов имеется по несколько последовательностей для связывания разных групп транскрипционных факторов.

Таким образом, возможно, АБК является уникальным фитогормоном, который может запускать разные системы рецепции и передачи сигнала для разных физиологических функций.

Функции АБК на уровне клетки:

1) активация каскада ионных каналов, приводящего к быстрому закрытию устьиц.

Функции АБК на уровне организма:

1) торможение роста растений, поскольку выступает антагонистом ауксинов, гиббереллинов и цитокининов;

2) ингибитор прорастания семян и роста почек;

3) стимулирует опадение листьев, цветков и плодов.

ЛЕКЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ

Тема 3. ФИТОГОРМОНЫ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

3.1. Зависимость дедифференцировки растительной клетки от присутствия в питательной среде фитогормонов

Содержание регуляторов роста обычно является определяющим фактором для успешного роста культур клеток растений. Из фитогормонов в составе сред наиболее часто используют ауксины и цитокинины. Поскольку различные клетки и ткани в культуре резко отличаются по способности к автономному синтезу и метаболизму отдельных групп фитогормонов, то в связи с этим их рост в различной степени зависит от снабжения регуляторами роста.

Различия в потребностях в экзогенных ауксинах и цитокининах позволяют выделить несколько групп тканей:

- ткани, растущие на средах только с ауксинами (например, экспланты корня женьшеня, эмбриогенные каллусы);
- ткани, требующие для роста введение в среду только цитокининов (культура микропобегов актинидии);
- ткани, для роста которых необходимы и ауксины и цитокинины (большинство культивируемых тканей);
- ткани, растущие на средах с растительными экстрактами сложного состава;
- опухолевые ткани, способные расти на средах без регуляторов роста.

Для роста большинства тканей в условиях *in vitro* необходимы и ауксины, и цитокинины. В качестве ауксинов для получения и поддержания культур тканей чаще всего используются ИУК в концентрации 1-30 мг/л, НУК в концентрации 0,1-2 мг/л, 2,4-Д в концентрациях менее 1 мг/л. Показано, что ИУК в 300 раз менее активна, чем 2,4-Д и в 30 раз менее активна, чем НУК, т.е. степень активности ауксинов возрастает от ИУК к 2,4-Д. Ауксины вызывают клеточную дедифференцировку, растяжение клеточной оболочки, деление клеток и образование каллуса.

В качестве источников цитокининов в искусственных питательных средах используют кинетин, 6-бензиламинопурин (БАП), зеатин. БАП и зеатин проявляют более высокую активность в поддержании роста изолированных тканей и индукции органогенеза по сравнению с кинетином. Цитокинины индуцируют деление клеток, образование боковых побегов. Оптимум концентраций ауксинов и цитокининов, необходимых для роста культур клеток и тканей, у разных видов растений сильно варьирует.

В каждом конкретном случае оптимальное их соотношение определяется экспериментальным путем. Для этой цели используется метод математического планирования эксперимента.

Из гиббереллинов в составе культуральных сред используют гибберелловую кислоту, как наиболее доступную для индукции побегообразования у розоцветных и поддержания роста суспензионных культур.

Абсцизовую кислоту применяют при культивировании протопластов. Для индукции первичного каллуса и реже для поддержания его роста иногда к питательной среде добавляют растительные экстракты или соки неопределенного состава, обладающие активирующими рост свойствами. Как правило, это эндоспермы незрелых зародышей и весенняя пасока некоторых деревьев. Наибольшей ростактивирующей способностью обладает кокосовое молоко – жидкий эндосperm кокосового ореха. Добавление в среду 5-10 % кокосового молока за 21 день приводило к увеличению сырого веса эксплантов моркови в 80-100 раз. Однако в настоящее время таких добавок стараются избегать в связи с трудностями воспроизведения результатов и наличия в них неизвестных факторов роста.

Питательные среды могут также включать и антиоксиданты: аскорбиновую кислоту, глутатион, дитиотриэтол, диэтилтиокарбамат, поливинилпирролидон.

3.2. Гормональная индукция каллусогенеза

Каллус (каллусная ткань) – это ткань, возникшая путем неорганизованной пролиферации клеток органов растений. Сам процесс образования каллуса называется *каллусогенезом*. *Пролиферация* – новообразование клеток путем размножения.

Особенности каллусных клеток. Каллусная ткань – основной тип ткани, получаемой при культивировании в условиях *in vitro* изолированных клеток и тканей растений. Каллусная ткань представляет собой аморфную массу тонкостенных паренхимных клеток, не имеющих определенной анатомической структуры. В зависимости от происхождения и условий выращивания она может быть разной консистенции:

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

Каллусная ткань в условиях *in vitro* в основном бывает белого или желтоватого, реже зеленоватого цвета. Очень редко она может иметь интенсивную зеленую окраску. Темно-коричневая окраска возникает чаще при старении каллусных клеток и связана с накоплением в них фенолов.

Каллусная клетка имеет свой цикл развития и повторяет развитие любой клетки (деление, растяжение, дифференцировка, старение, отмирание). Для того чтобы не происходило старение и отмирание каллусных клеток, через каждые 4-6 недель на свежую питательную среду переносят первичный каллус, возникший на *эксплантах* – фрагментах ткани или органа, которые были выделены и помещены на питательную среду. Эту операцию называют *пассивированием*. При регулярном пассивировании способность к делению может поддерживаться в течении десятков лет.

Каллусные клетки имеют много общего с нормальными клетками растений, входящими в состав растительного организма:

1) Рост каллусных клеток подчиняется общим закономерностям и описывается ростовой кривой Сакса (рисунок 3.1). Ростовая кривая каллусных клеток имеет S-образную форму. Кривая роста включает пять фаз. Во время 1-й латентной или лаг-фазы не происходит увеличения числа

или массы клеток. Клетки в этот период подготавливаются к делениям. Следующая, 2-я фаза – логарифмическая или экспоненциального роста – характеризуется наибольшей митотической активностью и увеличением массы каллусной ткани, кроме того, их рост происходит с ускорением. Далее наступает 3-я фаза – замедленного роста, когда митотическая активность каллусных клеток резко снижается. В 4-й – стационарной фазе – ростовая кривая выходит на плато. В этот период начинается деградация клеток, однако она еще уравнивается возрастанием числа клеток за счет их деления. В целом же скорость нарастания клеточной массы во время 4-й фазы равна нулю. После стационарной фазы наступает отмирание (деградация) клеток – 5-я фаза, во время которой число и масса живых каллусных клеток уменьшается.

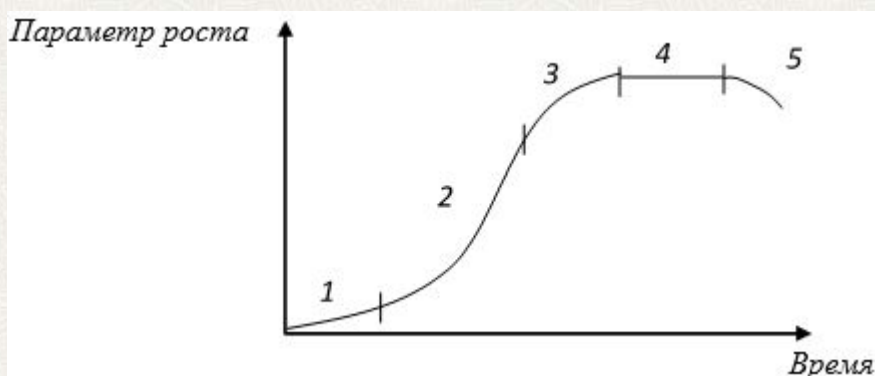


Рисунок 3.1 – S-образная кривая роста

Фазы роста: 1– латентная; 2 – логарифмическая;

3 – замедления; 4 – стационарная, 5 – деградации

2) Каллусные клетки сохраняют многие физиолого-биохимические черты, свойственные нормальной клетке. Например, способность к синтезу вторичных метаболитов, морозостойкость, устойчивость к высоким температурам, засолению и др.

3) Каллусным клеткам свойственна также фотопериодическая реакция, что связано с сохранением активности фитохрома.

Вместе с тем каллусные клетки обладают свойствами, отличающими их от нормальных клеток:

1) *физиологическая асинхронность*, т.е. рост каллусных клеток происходит асинхронно, неорганизованно и является неограниченным, в связи с этим в каллусной ткани присутствуют различные по возрасту клетки;

2) *генетическая гетерогенность*, т.е. генетическая нестабильность клеток каллусной ткани, выражающаяся в различной ploидности, в появлении хромосомных aberrаций, генных мутаций;

3) более длительный клеточный цикл чем у клеток растения, произрастающего в открытом грунте;

4) митохондрии в каллусной клетке также, как и в меристематической, являются слабо развитыми, в них мало крист, что сказывается на активности аэробного дыхания;

5) изменения в энергетическом обмене, направленные в сторону уменьшения потребления кислорода и усиления процессов брожения;

6) 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.

Способы культивирования каллусных клеток и тканей – *поверхностное и глубинное культивирование*. Если культивирование происходит поверхностно на агаризированной (твердой) питательной среде, то образуется каллусная ткань. Культуры клеток растений, выращиваемые в жидкой питательной среде, обычно называют суспензионными культурами.

Суспензионная культура представляет собой отдельные клетки, или небольшие группы клеток, выращиваемые во взвешенном состоянии в жидкой среде. Для этого применяют различную аппаратуру и способы поддержания их во взвешенном состоянии. Суспензионную культуру получают путем переноса каллусной ткани с твердой среды в колбу с жидкой питательной средой, либо непосредственно из запасающей паренхимы растений. Однако последний способ глубинного культивирования более длительный и трудоемкий.

Особенности морфогенеза каллусных клеток. Ход нормального развития растений полностью меняется в условиях *in vitro*. Остановка реализации исходной генетической программы клеток и тканей при культивировании в условиях *in vitro* приводит к дедифференцировке и пролиферации их в новом направлении. Признаки, характеризующие прохождение культивируемыми клетками отдельных этапов морфогенеза, еще недостаточно изучены, что не позволяет в настоящее время пока использовать культуру клеток и тканей в полной мере.

Морфогенез считается одним из самых сложных биологических явлений, обусловленных тотипотентностью клетки. *Морфогенез* – это процесс формирования органов (*органогенез*), тканей (*гистогенез*) и клеток (*цитогенез*, или *клеточная дифференцировка*).

Существует несколько гипотез о причинах перехода к формированию структур в культуре неорганизованно растущих клеток. Каждая из изложенных гипотез объясняет процесс морфогенеза лишь частично, но ни одна не может пока объяснить процесс в целом.

По первой из них, высказанной Ф. Скугом и Е. Миллером (1957) и нашедшей подтверждение в опытах с каллусной тканью табака, поведение культивируемых клеток определяется концентрацией и соотношением внесенных в питательную среду стимуляторов роста ауксиновой и цитокининовой природы. Преобладание ауксинов над цитокининами стимулирует образование корней, обратное соотношение приводит к появлению зачатков стебля, а примерно равное поддерживает активный неорганизованный рост клеток. Таким образом, различия в балансе экзогенных гормонов ауксинового и цитокининового типа определяет, с одной стороны, возможность перехода клетки в культуре к дедифференцировке и неорганизованной пролиферации, а с другой – индукцию вторичной дифференцировки того или иного типа морфогенеза.

По мнению Стэварда (1958) сам процесс изолирования клетки и культивирования ее вне организма служит причиной перехода ее к морфогенезу, т.е. стимулирует реализацию ее тотипотентности. Подтверждением этой гипотезы является *соматический эмбриогенез* – процесс образования зародышеподобных структур (*эмбриоидов*) в культуре клеток и тканей. Независимость соматического эмбриогенеза от экзогенных гормонов обусловлена тем, что развивающийся эмбриоид сам обеспечивает себя ими. Таким образом, основными стимулами морфогенеза являются изменения соотношения гормонов в питательной среде, а также сам

процесс изоляции растительной клетки от организма.

3.3. Взаимодействие фитогормонов в культуре тканей растений и управление морфогенезом каллусов *in vitro*

Экспериментальное изучение способности различных генотипов в пределах вида к морфогенезу в условиях *in vitro* показало, что в пределах каждого вида можно выделить генотипы резко контрастные по способности каллусных клеток к морфогенезу. Это свидетельствует о том, что данный признак контролируется генотипом. Расщепление потомства, полученного при скрещивании контрастных по способности к морфогенезу в условиях *in vitro* генотипов, позволяет судить о доминантности или рецессивности этого признака, моногенном или полигенном его характере. Скрещивание генотипов, морфогенетически активных в условиях *in vitro*, может увеличить регенерационную активность каллусов, полученных из тканей их потомства. Рядом исследователей продемонстрированы результаты, доказывающие, что кроме генотипа, важную роль играет характеристика исходной для получения каллуса ткани.

Геммогенез (побегообразование) происходит, когда в каллюсной ткани обособляется зона меристематически активных клеток. Этому способствует высокое содержание в среде культивирования цитокининов (кинетин, БАП). Геммогенез приводит к формированию большого количества растений-регенерантов из одного каллюса, но при этом формирующиеся растения-регенеранты не имеют корней, что требует обязательно дополнительного этапа – укоренения. Поэтому данный тип морфогенеза называют геммогенез, побегообразование или стеблевой органогенез.

Ризогенез – формирование каллюсом корней может происходить спонтанно или стимулироваться высоким содержанием в среде ауксинов. Обычно наблюдается при культивировании в условиях темноты. Данный путь морфогенеза не является полноценным для получения растений-регенерантов.

Для укоренения образовавшихся при микрклональном размножении почек (побегов), их необходимо пересадить на новую питательную среду. Черенки и побеги легко укореняются на средах с обедненным составом минеральных солей и обязательно содержащих ауксины – ИУК, НУК, ИМК. Проростки, сформировавшие корни в стерильных условиях, можно рассматривать как небольшие укорененные растения (растения-регенеранты), которые необходимо адаптировать к нестерильным обычным условиям выращивания (условия *ex vitro*). Такие растения лучше высаживать в грунт, когда полностью сформируются 5-6 листьев и достаточно разрастутся корни. Однако, разные виды культурных растений по-разному адаптируются к перенесению в нестерильные условия, и поэтому требуют специально подобранных условий культивирования в грунте, которые устанавливают экспериментально.

При *соматическом эмбриогенезе (эмбриодогенез)* в каллюсной ткани развиваются эмбриониды – зародышоподобные биполярные структуры, которые затем одновременно формируют апексы стебля и корня.

Таким образом, изучение морфогенеза у различных видов в культуре *in vitro* позволило сделать вывод о том, что данный процесс генетически обусловлен, а способность к реализации генетического потенциала зависит от степени дифференцировки клеток экспланта, взятого для получения каллюсной культуры. Кроме того, процесс развития растения из соматической клетки носит вероятностный характер и может начаться

только при совпадении целого ряда обстоятельств. Среди них выделяют: способность генотипа к индукции морфогенетических процессов в культуре *in vitro*; эпигенетическое состояние клеток, зависящее от характера ткани, из которой культивируемые клетки были получены; компетентность конкретной культивируемой клетки принять сигнал к перестройке программы развития и ответить на него.

Вместе с тем было выяснено, что в реализации наследственных возможностей к морфогенезу принимает участие еще один важный фактор – физиологическое влияние условий выращивания *in vitro*. Из трофических факторов сильнее всего влияют на морфогенез азотсодержащие вещества. Присутствие ионов аммония в питательной среде важно для индукции процесса морфогенеза, тогда как наличие нитрат-ионов важно для дальнейшего развития структур. Аминокислоты усиливают процессы соматического эмбриогенеза. Влияют на морфогенез и условия освещения, но уже на стадии развития регенеранта, а не на стадии индукции процесса, которая может происходить в темноте. Для индукции разных форм морфогенеза широко используются цитокинины и ауксины. Однако успешное использование различных стимуляторов роста растений все же не дает ответа на вопрос, являются ли они сигналом к перепрограммированию неорганизованно делящейся клетки на выполнение программы развития.

При вариации названных условий выращивания можно установить оптимум морфогенеза для различных генотипов в условиях *in vitro*.

ЛЕКЦИОННЫЙ МАТЕРИАЛ

Тема 4. ПРИМЕНЕНИЕ ФИТОГОРМОНОВ В АГРОТЕХНОЛОГИЯХ

4.1. Фитогормоны и синтетические регуляторы роста в растениеводстве

В настоящее время в практике растениеводства получили широкое распространение *синтетические регуляторы роста* растений. К ним относятся *индолил-масляная (ИМК), индолил-пировиноградная и а-нафтилуксусная кислоты (НУК)*, способные регулировать рост подобно ИУК. Экзогенные стимуляторы роста растений используются при предпосевной обработке семян, укоренении черенков, пересадке овощных и цветочных культур, а также взрослых древесных растений для предупреждения преждевременного опадения плодов. Синтетический гиббереллин используется для получения партенокарпических (бессемянных) плодов винограда, увеличения длины волокон у конопли и льна, получения большего числа листьев у чайного растения, повышения выхода и качества декоративных растений.

Наибольшее распространение в практике лесного хозяйства получила *калиевая соль гетероауксина* для ускорения укоренения черенков и повышения выхода посадочного материала древесных пород. Обычно рекомендуются следующие нормы этого препарата в зависимости от вида дерева и состояния черенков: 200–250 мг/л воды для одревесневших, 150–250 мг/л полуодревесневших и зеленых черенков древесных растений и 50–70 мг/л – черенков травянистых растений. В практике озеленения городов наряду с использованием гетероауксина в черенковании древесных пород успешно используют обработку клубнелуковиц гладиолусов и других цветочных культур аналогами ИУК и гиббереллина, что повышает качество (товарность) и выход большего числа цветущих экземпляров.

Ингибиторы роста обладают свойствами, способными подавлять действие стимуляторов или тормозить их синтез. Они чрезвычайно широко распространены в семенах, покоящихся почках, глазках картофеля. Значительные количества ингибиторов накапливаются в почках осенью, тормозя их распускание. Даже обработка таких почек гиббереллином не выводит их из состояния покоя. Весной концентрация ингибиторов снижается, и почки трогаются в рост. Осеннее накопление ингибиторов способствует переходу почек в состояние покоя, когда они становятся более устойчивыми к зимним невзгодам. С ингибиторами роста связано и одревеснение побегов древесных растений, способствующее их успешной перезимовке.

В химическом отношении ингибиторы представляют собой производные фенолов или терпеноидов. Наиболее широко распространенными ингибиторами фенольной природы являются *бензойная, коричная, салициловая кислоты и кумарин*.

Синтетические ингибиторы роста, используемые для борьбы с сорной травянистой растительностью, получили название *гербицидов*, а с древесной – *арборицидов*. Эти вещества, воздействуя на целые ферментные

системы, нарушают обмен веществ и энергии, приводя растения к гибели. В качестве гербицидов применяют *2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д)*, *2-метил-4-хлорфеноксиуксусную кислоту (2М-4Х)*, *гидразид малеиновой кислоты (ПАК)*, *симазин*, *атразин* и некоторые другие. Гербициды отличаются высокой избирательностью. Так, 2,4-Д и 2М-4Х способны уничтожать двудольные сорняки злаковых культур, не повреждая последних. Особую группу синтетических регуляторов роста представляют *ретарданты*, предотвращающие полегание растений. Их действие основано на ингибировании роста стебля при одновременном активировании развития механической ткани в последнем, что и приводит к большей сопротивляемости к полеганию. Показано, что ретарданты отрицательно влияют на синтез гиббереллинов в растении. Яркими представителями ретардантов являются *хлорхолинхлорид (ССС)* и *бромхолинхлорид (ВСС)*.

В практике сельского хозяйства широкое применение получают также *дефолианты и десиканты*, вызывающие при опрыскивании ими растений опадение или подсыхание листьев, например, у хлопчатника, картофеля и других культур, что облегчает механизированную уборку урожая. Наиболее известным представителем этой группы химических соединений выступает *хлорат магния ($Mg(ClO_3)_2$)*.

4.2. Применение фитогормонов в технологиях на основе клеточных культур растений

Существенное увеличение урожая сельскохозяйственных культур в XX веке достигнуто за счет химизации, механизации и мелиорации сельского хозяйства, что привело к загрязнению окружающей среды, истощению энергетических ресурсов, возрастанию затрат на единицу продукции. Кроме того, дополнительный прогресс в улучшении сельскохозяйственных культур в большинстве случаев достиг своего предела. В связи с этим в настоящее время большое внимание уделяется поиску и внедрению новых подходов, объединяющих классические методы и современные технические приемы для решения существующих проблем в сельском хозяйстве и промышленности. Перспективным в этом направлении является применение технологий на основе клеточных культур растений.

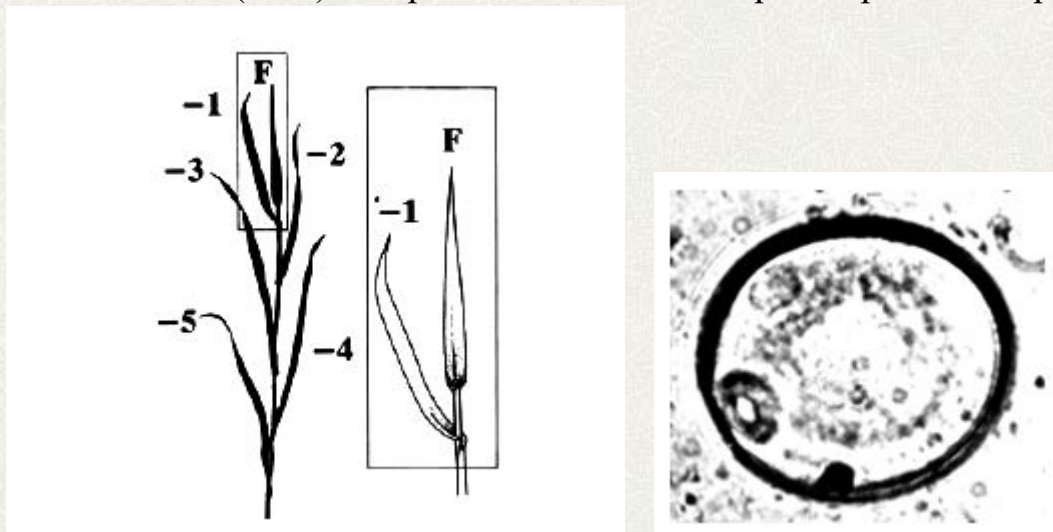
Для каждого вида растений и типа экспланта может быть разработано несколько методов культивирования, однако, как правило, лишь один оказывается наиболее эффективным. Совершенствование систем культивирования эксплантов различных видов растений, в том числе и злаков, остается актуальным и определяет цели, задачи научных исследований.

На примере важной зерновой культуры мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) рассмотрим методические приемы по подбору условий для наибольшей реализации морфогенетического потенциала культивируемого экспланта (изолированных пыльников, незрелых и зрелых зародышей, листовых эксплантов).

Метод культивирования изолированных пыльников и микроспор основан на использовании явления андрогенеза *in vitro* – процесса образования гаплоидного растения-регенеранта (спорофита) из микроспоры или клеток пыльцевого зерна – гаметофита высших растений. Это уникальное явление связано с переключением генетической программы развития спорогенных клеток с обычного для них гаметофитного пути на

принципиально иной – спорофитный путь развития в условиях *in vitro*, в результате чего образуется из инициальной клетки пыльника гаплоидное растение-регенерант. Метод культуры пыльников – один из наиболее перспективных подходов в области биотехнологии, поскольку его использование позволяет значительно сокращать сроки выведения линий и сортов экономически ценных культур, легко обнаружить рецессивные мутации, проводить селекцию клеточных линий, устойчивых к патогенам, засухе, засолению.

Метод культуры *in vitro* пыльников пшеницы включает несколько этапов. На начальном этапе производят выделение пыльников из колосьев пшеницы на критической стадии, во время которой сильновакуолизированные микроспоры компетентны к переключению программы развития. Стадию, определяющую успешное культивирование пыльников, устанавливают по фенотипическому маркеру развития растения пшеницы (рисунок 4.1). Она соответствует той фазе развития растения, когда влагалище следующего за флаговым листом расположено на середине колоса, находящегося в трубке, или кончик колоса должен находиться на $\frac{1}{4}$ расстояния от лигулы флагового листа до влагалища следующего листа. Это было выявлено благодаря исследованиям, в которых использован системный подход с привлечением концепции критических стадий развития репродуктивных органов растений и оценкой структурной организации пыльника. Следует отметить, что необходимо проводить корректировку диагностического значения фенотипического маркера с учетом генотипа яровой мягкой пшеницы, поскольку для каждого генотипа критическая стадия развития пыльника устанавливается положением кончика находящегося в трубке колоса на строго определенном участке от основания предпоследнего листа до основания флагового листа. В связи с этим, оптимальную стадию развития микроспор (рисунок 4.2) контролируют с помощью цитологического анализа временных давленных препаратов пыльников, взятых из первого (нижнего) цветка колосков средней трети колоса, фиксированных в смеси 96%-ного этанола и ледяной уксусной кислоты (3 : 1) и окрашенных в 5%-ном растворе ацетокармина.



1 – второй лист; 2 – третий лист; Рисунок 4.2 – Одноядерная сильновакуолизированная
3 – четвертый лист; 4 – пятый лист; микроспора пшеницы
5 – шестой лист;
F – флаговый (первый) лист
Рисунок 4.1 – Стадия полного развития

флагового листа (Дорофеева и др., 2007)

В качестве донорных предпочтительнее использовать растения мягкой пшеницы, выращенные в полевых условиях, поскольку частота индукции новообразований у пыльников в этом случае выше, чем у пыльников тепличных растений. Особенно это актуально для генотипов, чувствительных к интенсивности освещения и продолжительности светового дня, поскольку в их тканях происходит нарушение соотношения и уровня эндогенных фитогормонов при изменении условий освещения, а это, в свою очередь, затрудняет подбор оптимальных концентраций экзогенных фитогормонов, вводимых в питательную среду.

Срезанные колосья мягкой пшеницы перед извлечением пыльников подвергают обработке низкой положительной температурой 3–5 °С, помещая их в холодильную камеру, в течение 7–10 суток. Холодовая предобработка пыльников при посадке их на питательную среду служит специальным приемом, используемым для повышения эффективности андрогенеза *in vitro*. Эффект холодовой предобработки заключается в снижении доли дегенерирующих микроспор и, главным образом, в блокировке митотического деления микроспор и, тем самым, синхронизации популяции микроспор до начала культивирования на фазе развития, благоприятной для индукции спорофитного пути.

Поверхностную стерилизацию колосьев проводят 70%-ным этанолом в течение 10 минут. По окончании стерилизации в асептических условиях выделяют пыльники, находящиеся в критическом периоде развития с микроспорами в сильновакуолизированной фазе, из нижних цветков колосков средней трети колоса.

Второй этап – посадка пыльников на питательную среду – выполняют в ламинарном боксе. Изолированные пыльники пшеницы переносят на поверхность агаризированной питательной среды, которая содержит минеральные соли, витамины, сахарозу преимущественно по прописи Мурасиге и Скуга. При работе с культурой пыльников злаков, в том числе и пшеницы, используют и другие питательные среды (С17; Гамборга; картофельная среда Potato II (или Р II)).

Большинство исследователей в качестве регулятора роста применяют в малых дозах 2,4-Д – синтетический фитогормон, аналог природного ауксина ИУК. Обычно подбор оптимальной концентрации вводимого в состав среды 2,4-Д для культивирования пыльников определенного генотипа производят экспериментально. Однако в последнее время наметились другие подходы, позволяющие ускорить подбор концентрации экзогенного ауксина с учетом фитогормональных особенностей генотипов пшеницы, а именно с учетом содержания эндогенного ауксина в пыльниках перед инокуляцией.

Культивирование пыльников – третий этап – производят в термостате при температуре 28–30 °С обычно в темноте семь дней или до появления первых андроклинных структур (эмбриоидов или каллусов), далее культивируют при 24–26 °С. Обеспечение нормальных условий культивирования способствует получению хороших результатов.

В культуре пыльников *in vitro* образование растения-регенеранта возможно двумя путями – эмбриоидогенеза или каллусогенеза, связанными соответственно с формированием эмбриоидов и каллусов. Эмбриоид – зародышеподобная биполярная структура, аналогично зиготическому

зародышу, характеризуется сопряженным развитием апексов побега и корня, развиваясь как отдельная (от материнского организма или каллуса) единая система. В связи с этим, морфогенетические процессы в культуре пыльников различных генотипов пшеницы оценивают по общей частоте отзывчивых пыльников, по частоте образования эмбриоидов, по частоте формирования морфогенных андроклинных каллусов. Все показатели рассчитывают по отношению количества андроклинных структур к общему количеству инокулированных пыльников, выраженному в процентах.

Андроклинные структуры, достигшие в диаметре 1 мм (примерно на 30–40 сутки), переносят в стерильных условиях на среду для регенерации (модифицированная питательная среда Мурасиге и Скуга). В качестве гормональной добавки используют ауксины (ИУК) и цитокинины (кинетин). Хотя роль цитокининов для дальнейшей дифференциации морфогенетически компетентных культивируемых клеток злаков меньше, по сравнению с ауксинами, однако их присутствие в питательной среде необходимо (иногда достаточно только наличия эндогенных цитокининов). Известно, что цитокинины повышают аттрагирующую способность клеток, т.е. способность аккумулировать питательные вещества за счет их транспорта из других тканей, что, в свою очередь, может способствовать дальнейшему развитию культивируемых клеток.

Культивирование эмбриоидов производят в камере для роста растений при температуре 22 °С, 16-часовом фотопериоде и освещении около 3000 лк. Развившиеся зеленые регенеранты на стадии 3–5 листьев с хорошей корневой системой адаптируют к условиям *ex vitro*, выращивают до фазы полной спелости зерна. Для цитологического контроля уровня пloidности растений-регенерантов используют методику подсчета хромосом в клетках кончиков корней пшеницы, разработанную в отделе цитогенетики Института селекции растений в Кембридже.

Метод культивирования *in vitro* зародышей успешно используется для регенерации растений селекционных линий и коммерческих сортов мягкой яровой и озимой пшеницы, для построения различных модельных систем *in vitro*, имитирующих природные стрессы на уровне растительных эксплантов, с целью отбора толерантных форм растений.

При выборе экспланта у злаков необходимо учитывать его природу, поскольку она является основным фактором, определяющим морфогенетическую способность клеток зародыша к формированию каллуса и дальнейшую регенерацию растений в условиях культуры *in vitro*. В качестве экспланта для получения *in vitro* морфогенного каллуса у злаков перспективным является использование незрелых зародышей. Зародыши, инокулированные на стадии сформировавшегося зародыша, дают начало проросткам. Для формирования морфогенных каллусов инокулируемые незрелые зародыши должны находиться на определенной фазе развития. Для яровой мягкой пшеницы экспериментально установлена оптимальная фаза – это подстадия 3 органогенеза на 12,5–17,0 сутки после опыления, когда длина зародыша достигает 1,5–2,0 мм. Стадия сформированного зародыша приходится на 20,0 сутки после опыления, когда длина зародыша составляет 2,1–2,2 мм.

Зерновки пшеницы перед выделением зародышей стерилизуют 30%-ным раствором гипохлорита натрия, затем трехкратно промывают автоклавированной дистиллированной водой.

Зародыши, используемые в качестве эксплантов, инокулируют в

асептических условиях и помещают щитками вниз на агаризированную питательную среду Мурасига и Скуга с добавлением 2,4-Д. Согласно представленным в литературе данным, концентрация 2,4-Д играет определенную роль в формировании морфогенного каллуса, хотя и не главенствующую.

Культивируют зародыши в темноте при температуре 26 °С. Образовавшиеся морфогенные каллусы пересаживают на модифицирующую среду Мурасиге и Скуга, содержащую уменьшенное в два раза количество 2,4-Д. Чашки с пересаженными морфогенными каллусами инкубируют при температуре 22 °С и 16-часовом фотопериоде с интенсивностью освещения 3 000 лк. В культуре незрелых зародышей оценивают частоту каллусообразования, частоту образования морфогенных каллусов с зелеными зонами, а также частоту формирования проростков.

Через 3–4 недели морфогенные каллусы с зелеными зонами переносят на среду для регенерации, содержащую соли и витамины по Мурасиге и Скугу, с введением ИУК и кинетина. Поведение культивируемых клеток определяется концентрацией и соотношением внесенных в питательную среду стимуляторов роста ауксиновой и цитокининовой природы. Преобладание ауксинов над цитокининами стимулирует образование корней (корневой органогенез или ризогенез), обратное соотношение приводит к появлению зачатков стебля (стеблевой органогенез) или соматическому эмбриогенезу. В процессе побегообразования в каллусе обособляется зона меристемоактивных клеток (их, как правило, восемь – шестнадцать), из которых и формируется растение-регенерант. Обычно побегообразованию предшествует формирование органогенного (эмбриогенного) каллуса со множеством меристемоактивных зон, что сопровождается образованием множества растений-регенерантов в пределах одного каллуса. Образующиеся растения-регенеранты не имеют корней, поэтому необходимо их укоренить. Отсюда и название «побегообразование», или «стеблевой органогенез», так как формируется неполноценное растение.

При соматическом эмбриогенезе происходит образование зародышеподобных структур (*эмбриоидов*) из соматических клеток культивируемых *in vitro*. Соматический эмбриоид – биполярная структура, в которой одновременно развиваются апексы стебля и корня. Этот процесс напоминает зиготический эмбриогенез. Формирование эмбриоидов в культуре тканей происходит в два этапа: 1) клетки экспланта дедифференцируются и под влиянием ауксинов превращаются в эмбриональные; 2) при уменьшении концентрации ауксинов или их исключении из питательной среды образуются эмбриоиды из эмбриональных клеток.

В целом для любого типа регенерации *in vitro* можно выделить четыре группы факторов, определяющих ее успех: 1) генотип и состояние родительского растения; 2) состояние экспланта; 3) особенности введения экспланта в стерильную культуру; 4) условия культивирования.

Выбор *метода культивирования in vitro листовых эксплантов* в экспериментальных исследованиях основан на возможности получения в большом количестве молодых листочков независимо от вегетационного периода развития растений. Этот метод широко применяется во многих биотехнологических направлениях, включающих соматическую гибридизацию, генетическую трансформацию, микрклональное

размножение. Каллусы, полученные из листовых эксплантов и незрелых зародышей пшеницы, можно использовать для изучения солеустойчивости, устойчивости к температурному стрессу, для получения суспензий и протопластов.

В качестве эксплантов используют базальные участки листовых пластинок пшеницы, которые изолируют на 4–5 день после прорастания семян. Ростки отделяют от семян и стерилизуют 30%-ным раствором гипохлорита натрия. Для каллусообразования в чашку Петри диаметром 40 мм помещают по 10 листовых эксплантов на питательную среду, приготовленную по прописи Мурасиге и Скуга, и дополненную фитогормоном 2,4-Д в концентрации 2,0 мг/л. Культивирование листовых эксплантов на данной среде проводят в течение 3–4 недель при температуре 26 °С в темноте.

Оценку отзывчивости листовых эксплантов на условия культивирования *in vitro* проводят по таким параметрам, как количество листовых эксплантов с образующимися каллусами, число образующихся каллусов и тип каллусов. Частоту каллусообразования (в %) определяют как отношение числа образовавшихся каллусов к исходному количеству эксплантов.

Образовавшиеся первичные каллусы пересаживают на питательную среду такого же состава и культивируют в климатической камере для роста растений при освещенности 3 000 лк, 16-часовом фотопериоде и температуре 22 °С в течение трех недель. Затем переносят на модифицирующую питательную среду Мурасиге и Скуга, содержащую уменьшенное количество 2,4-Д (1,0 мг/л), и культивируют при тех же условиях. Через 3–4 недели морфогенные каллусы с зелеными зонами переносят на среду для регенерации, как и в случаях с зародышами и пыльниками. Регенерированные растения с развитой корневой системой высаживают в почву. Срок, необходимый для прохождения всех стадий регенерации растений из тканевых культур листового экспланта, составляет около двух месяцев.

ПРАКТИКУМ

Практическое занятие 1

Фитогормональная сигнализация

Задание 1.1. Выполните практическую работу «Влияние ауксинов на рост отрезков coleoptилей злаков».

Материалы и оборудование: этилированные 3-4-х дневные проростки пшеницы (ячменя, овса, кукурузы); раствор β -индолилуксусной кислоты (ИУК) или 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) в концентрации 1 г/л; дистиллированная вода; чашки Петри; миллиметровая бумага; мерные цилиндры; химические стаканы объемом 50-100 мл; пинцеты; скальпеля; препаровальные иглы; термостат.

Ход работы:

1. Отберите проростки пшеницы (ячменя, овса, кукурузы) одного размера, выращенные в темноте в условиях термостата в течение 3-4 дней.
2. Отделите coleoptили, затем с помощью линейки или миллиметровой бумаги отрежьте скальпелем сегмент длиной 5 мм, отступая от верхушки 3 мм (рисунок 1.1, а).
3. Из отрезанного сегмента coleoptиля с помощью препаровальной иглы и пинцета удалите первичный лист (рисунок 1.1, б) и поместите отрезок (рисунок 1.1, в) в чашку Петри с дистиллированной на 15-20 мин для освобождения от эндогенных ауксинов.

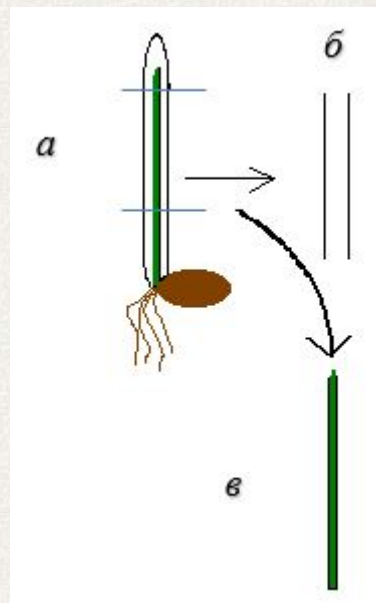


Рисунок 1.1 – Подготовка отрезков coleoptилей к эксперименту

4. Из маточного раствора в концентрации 1 г/л приготовьте набор концентраций ауксинов – ИУК либо 2,4-Д (100, 50, 10, 5, 1 и 0,5 мг/л).
5. В чашки Петри налейте по 25 мл раствора приготовленной определенной концентрации исследуемых ауксинов и перенесите в них по 3–5 отрезков coleoptилей.
6. Приготовьте контроль – чашку Петри с 25 мл дистиллированной воды, в которую также поместите 3–5 отрезков coleoptилей.
7. В течение 2–2,5 часов проведите инкубацию чашек Петри с отрезками coleoptилей в термостате с температурой 24,5 °С.
8. После инкубации извлеките пинцетом отрезки coleoptилей и измерьте их длины.
9. Полученные результаты занесите в таблицу 1.1.

Таблица 1.1 – Изменение длины coleoptiles пшеницы под влиянием различных концентраций экзогенного ауксина

Концентрация ауксина, мг/л	Начальная длина отрезков, мм	Прирост в длину, мм	Прирост, % от контроля

10. Сделайте вывод о величинах концентраций ИУК и 2,4-Д, оптимальных для стимуляции удлинения coleoptiles злаков.

Задание 1.2. Выполните практическую работу «Влияние цитокининов и брассиностероидов на энергию прорастания семян».

Материалы и оборудование: семена ячменя или пшеницы; чашки Петри, фильтровальная бумага, химические стаканы, мерные цилиндры, пипетки, ножницы, маточные растворы 6-бензиламинопурина (6-БАП), эпибрассинолида в концентрации 0,1 %, KMnO_4 , дистиллированная вода, термостат.

Ход работы:

1. Приготовьте растворы регуляторов роста (6-БАП, эпибрассинолида) в концентрациях 0,0001 %, 0,0005 % и 0,001 % объемом по 20 мл.

2. Стерилизацию семян ячменя или пшеницы проведите в слабо-розовом растворе перманганата калия в течение 10-15 минут, после чего их тщательно промойте дистиллированной водой.

3. Разложите по 100 семян ячменя или пшеницы в чашки Петри на подложку из фильтровальной бумаги и добавьте 20 мл дистиллированной воды (контроль) или раствора исследуемого регулятора роста.

4. Чашки закройте и поместите в термостат с температурой 24,5 °C для наблюдений.

5. Ежедневно на несколько секунд приоткрывайте крышки чашек Петри.

6. Проведите на 3-й день визуальный учет количества проросших семян для определения энергии прорастания ячменя или пшеницы.

7. Полученные результаты занесите в таблицу 1.2.

Таблица 1.2 – Зависимость энергии прорастания семян пшеницы от концентрации экзогенного фитогормона

Регулятор роста	Энергия прорастания, %			
	0	0,0001 %	0,0005 %	0,001 %
6-БАП				
Эпибрассинолид				

8. Сделайте вывод о характере влияния изученных регуляторов роста на энергию прорастания семян ячменя или пшеницы в зависимости от их химической природы и концентрации.

Вопросы и задания для самоконтроля

1. В чем заключается механизм активации роста клеток растяжением под действием ауксинов?
2. Что такое «кислый рост»? В чем заключается его отличие от ауксининдуцированного роста растяжением?
3. В каких концентрациях экзогенные ауксины вызывают стимуляцию роста клеток растяжением?
4. С чем связано торможение ростовых процессов под действием сверхоптимальных концентраций ауксинов?
5. Что такое энергия прорастания семян?
6. Какие этапы включает процесс прорастания семян?
7. Какие факторы регулируют прорастание семян?
8. С помощью каких фитогормонов можно стимулировать прорастание семян?

Темы для реферативных сообщений

1. Фитогормональная стимуляция корнеобразования при вегетативном размножении растений.
 2. Гормональная регуляция покоя и прорастания.
 3. Гормоны и развитие корней растений.
 4. Фитогормоны и развитие побега.
 5. Фитогормональная инициация цветения.
 6. Гормоны, регулирующие развитие и созревание плодов.
 7. Гормоны и опадение листьев и плодов.
 8. Эндогенная гормональная регуляция водного баланса у растений.
 9. Влияние обработки экзогенными гормонами в связи с водным стрессом.
 10. Фитогормоны в устойчивости к биотическим стрессам.
-

Практическое занятие 2

Фитогормоны в культуре *in vitro*

Задание 2.1. Выполните практическую работу «Поддержание асептики при проведении работ с культурой изолированных клеток и тканей растений».

Материалы и оборудование: автоклав; сухожаровой стерилизатор; колбы с питательной средой; набор металлических инструментов (пинцеты, скальпель, ножницы); стеклянные чашки Петри, пробирки, пипетки градуированные, банки; ватно-марлевые пробки; бумага Крафта; индикаторы контроля стерилизации; ламинарный бокс.

Ход работы:

1. Актуализируйте знания основных принципов организации и проведения работ в стерильных условиях.

2. Ознакомьтесь с устройством и работой имеющихся моделей автоклава, сухожарового стерилизатора и ламинарного бокса.

3. Подготовьте лабораторную посуду (чашки Петри, пробирки, пипетки градуированные), металлические инструменты (пинцеты, скальпеля, ножницы) и вспомогательные материалы (ватно-марлевые пробки, салфетки из марли, подложки из бумаги) для стерилизации.

4. Простерилизуйте металлические инструменты и вспомогательные материалы сухим жаром при температуре 180 °С в течение 1 часа.

5. Простерилизуйте стеклянную посуду, штативы с пробирками, колбы, заполненные питательной средой, колбы с дистиллированной водой (закрытые фольгой) в автоклаве горячим паром в течение 20 минут при давлении в стерилизационной камере 0,5 атм.

6. Простерилизованные материалы принесите в ламинарный бокс.

Задание 2.2. Выполните практическую работу «Приготовление питательных сред с различным содержанием фитогормонов».

Материалы и оборудование: маточные растворы микро- и макросолей, реактивы, фитогормоны, дистиллированная вода, колбы для питательных сред, аналитические весы, магнитная мешалка, рН-метр, автоклав.

Ход работы:

1. Ознакомьтесь с составом основных питательных сред, используемых для культивирования изолированных клеток и тканей растений (таблица 2.1).

Среда Мурасиге–Скуга – наиболее универсальная и многоцелевая, пригодная для растительных клеток многих видов. Эта среда содержит хорошо сбалансированный состав питательных веществ и отличается соотношением аммонийного и нитратного азота. Среда Гамборга, или В-5, дает хорошие результаты при культивировании клеток и тканей двудольных растений. В состав питательных сред

Мурасиге–Скуга, Гамборга входит натриевая соль ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты), которая повышает доступность железа для клеток в широких пределах рН в течение всего периода роста культуры. Модификация питательных сред, их конкретный химический состав определяются объектом исследования и поставленной задачей.

В целом в состав питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей входят необходимые растениям компоненты, которые можно разделить на шесть групп.

Группа А – соли макроэлементов (азота, фосфора, калия, кальция, магния, серы, железа).

Группа Б – соли микроэлементов (бора, марганца, цинка, меди, молибдена и др.).

Группа В – источники углерода (сахароза или глюкоза в концентрации 2–3 %).

Группа Г – фитогормоны или их синтетические аналоги.

Группа Д – органические добавки и витамины.

Группа Е – различные добавки.

Неорганические соли (макро- и микросоли) являются основными питательными веществами, необходимыми для активации роста изолированных от растения эксплантов. Чаще всего при составлении питательных сред соотношения макросолей берут по прописи известных сред, а количественные соотношения микросолей могут меняться в зависимости от вида растения.

Таблица 2.1 – Состав питательных сред Мурасиге–Скуга, Гамборга для культивирования изолированных тканей растений

Компоненты среды	Концентрация, мг/л	
	Среда Мурасиге– Скуга (МС)	Среда Гамборга (B ₅)
<i>Макросоли</i>		
NH ₄ NO ₃	1650	–
KNO ₃	1900	3000
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	150
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	250
(NH ₄) ₂ SO ₄	–	134
KH ₂ PO ₄	170	–
Na ₂ ЭДТА	37,3	37,3
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8	27,8
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	–	150
<i>Микросоли</i>		
H ₃ BO ₃	6,2	3,0
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3	–
MnSO ₄ · H ₂ O	–	10,0
ZnSO ₄ · 4H ₂ O	8,6	–
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	–	2,0
KI	0,83	0,75
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	0,25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	0,025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025	0,025
<i>Органические добавки и витамины</i>		
Глицин	2,0	–
Мезоинозит	100	100

В ₃ (РР; Никотиновая кислота)	0,5	1,0
В ₆ (Пиридоксин-НCl)	0,5	1,0
В ₁ (Тиамин- НCl)	1,0	10,0
<i>Фитогормоны</i>		
2,4-Д; ИУК; НУК	*	*
Кинетин; БАП	*	*
<i>Источник углерода</i>		
Сахароза	30 000,0	20 000,0
<i>Уплотнитель</i>		
Агар	7 г7 г	7 г
<i>pH</i>	5,7-5,8	5,7-5,8

Примечание: * – состав гормональных препаратов варьируется в зависимости от объекта культивирования

2. Ознакомьтесь с составом маточных растворов для питательной среды Мурасиге–Скуга (таблица 2.2).

Таблица 2.2 – Состав маточных растворов по прописи среды Мурасиге–Скуга

Обозначение компонентов	Состав	Маточные растворы		Объем маточного раствора в мл для приготовления 1 л среды
		количество в г	объем воды в мл, условия	
Макросоли	NH ₄ NO ₃	16,5	500	50
	KNO ₃	19,0		
	KH ₂ PO ₄	1,7		
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	3,7		
Микросоли	H ₃ BO ₃	0,310	250	5
	ZnSO ₄ · 4H ₂ O	0,430		
	KI	0,0415		
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,0125		
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,00125		
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,00125		
	MnSO ₄ · 4H ₂ O	1,115		
Микросоли	Na ₂ ЭДТА	0,9325	250, нагреть до кипения	10
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,695		

Маточные растворы – это высококонцентрированные растворы макро- и микросолей, витаминов и фитогормонов, которые готовят заранее и хранят в холодильнике с целью оптимизации процесса приготовления питательных сред. Растворы макросолей готовят в 10–20 раз более концентрированными, чем нужно, растворы микросолей – в 100 раз более концентрированными. Для приготовления раствора витамина берут десятикратную по отношению к добавляемой дозе навеску и

растворяют в 10 мл воды. В 1 мл этого раствора содержится порция витамина, необходимая для приготовления 1 л раствора по прописи Мурасиге–Скуга. Концентрированные растворы каждого в отдельности витамина хранят в закрытых колбах.

Количество солей, необходимое для приготовления маточных растворов, а также количество маточного раствора, которое нужно взять для приготовления 1 л питательной среды Мурасиге–Скуга, приведены в таблице 2.2. Полученные маточные растворы сливают в колбы с притертой пробкой, снабжают этикеткой и хранят в холодильнике. Хелат железа хранят в темной склянке.

3. Приготовьте маточные растворы основных фитогормонов, руководствуясь следующими рекомендациями.

Фитогормоны – вещества, плохо растворимые в воде, поэтому их растворы готовят в небольших количествах следующим образом.

Растворы *ауксинов* (2,4-Д, НУК, ИУК) можно приготовить заранее. Для этого 25 мг гормона растворяют в 0,5–2 мл 96%-ного этанола, добавляют теплую дистиллированную воду до 25 мл, подогревают до полного растворения (концентрация 1 мг/мл).

Цитокинины (кинетин, зеатин, БАП), как правило, готовят во время приготовления питательной среды. Необходимую навеску фитогормона растворяют в небольшом объеме 1 н NaOH, подогревают, добавляют соответствующий объем дистиллированной воды.

В качестве растворителя для *гиббереллиновой кислоты* используют небольшой объем 96%-ного этанола, в качестве разбавителя – дистиллированную воду.

4. Приготовьте питательную среду определенного состава, руководствуясь следующими основными подходами.

Используя маточные растворы, готовят 1 л питательной среды для культивирования эксплантов растений. Для этого в химический стакан или колбу емкостью 1 л наливают 500 мл дистиллированной воды, добавляют необходимое количество маточных растворов макросолей, микросолей и хелата железа, затем навески $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,44 г, мезоинозита 0,1 г, сахарозы 30 г. Помещают емкость со средой на магнитную мешалку для растворения навесок. Затем добавляют витамины и фитогормоны, после чего доводят объем питательной среды до 1 л дистиллированной водой и измеряют pH. Корректировку pH питательной среды производят с помощью 0,1 н NaOH или 0,1 н HCl.

Агар в количестве 6 г добавляют в питательную среду, после чего емкость со средой ставят на 10–15 минут в микроволновую печь для его растворения. Возможно, порционное добавление агара или фитогея непосредственно в колбы соответствует объему наливаемой в них среды.

5. Проавтоклавируйте приготовленную питательную среду, принимая во внимание следующие рекомендации.

Среды обычно стерилизуют в пробирках или колбах. При этом емкости заполняют средой не более чем на $\frac{1}{2}$ их объема, что позволяет жидкости закипать во время цикла автоклавирования и предотвращает смачивание пробок. Сосуды со средами закрывают фольгой или ватными пробками, обернутыми марлевой салфеткой. Такие пробки предохраняют питательную среду от загрязнения микрофлорой, находящейся в окружающем воздухе, а также обеспечивают прохождение пара в сосуд при стерилизации. Если сосуды закрывают крышками, то они должны быть закрыты не плотно, чтобы давление, создающееся во время стерилизации, не разорвало емкость. При закрывании емкости поступают следующим образом. Закрывают крышку руками, не прилагая излишних усилий, затем откручивают ее на полповорота. По окончании времени стерилизации и выключения нагрева автоклава необходимо дождаться, пока давление в стерилизационной камере не сравняется с атмосферным. Лишь после этого открывают клапан, выводящий пар. Преждевременное открывание крана недопустимо, так как перегретые среды при резком снижении давления сразу же бурно закипают, смачивают и даже иногда выталкивают ватные пробки, что нарушает впоследствии стерильность материала.

Режим (температура и длительность) автоклавирования питательных сред определяется, прежде всего, их составом и термоустойчивостью компонентов. Наиболее оптимальными и надежными при стерилизации питательных сред, приготовленных по прописи Мурасиге–Скуга, Гамборга, считаются

режимы автоклавирования при 121 °С (1 атм) от 15 до 45 минут в зависимости от объема стерилизуемых сред. Так, чем больше объем, тем больше времени требуется при одной и той же температуре (давлении) для обеспечения надежности стерилизации. Необходимо помнить также, что при автоклавировании от 3 до 5 % жидкости теряется в результате испарения, поэтому рекомендуется в среды перед стерилизацией добавлять примерно 5 % дистиллированной воды сверх объема.

После автоклавирования может измениться первоначальный состав термолабильных компонентов среды. Так, тиамин распадается на пиримидин и тиазол, а кинетин и ИУК теряют часть своей активности. В связи с этим витамины и особенно термолабильные фитогормоны предпочтительнее стерилизовать фильтрованием, пропуская через мелкопористые фильтры. В этом случае для регуляции pH среды после автоклавирования используют стерильные растворы щелочи. После автоклавирования питательную среду рекомендуется выдержать 2–3 дня при температуре 25 °С для проверки ее стерильности. В случае обнаружения в питательной среде бактериального заражения ее готовят заново.

Задание 2.3. Выполните практическую работу «Техника работы в ламинарном боксе».

Материалы и оборудование: ламинарный бокс, колбы со стерильной питательной средой, стерильная стеклянная посуда (пробирки, банки), стерильные металлические инструменты, стерильные вспомогательные материалы, 70%-ный раствор этилового спирта, стерильные перчатки (хлопчатобумажные и по желанию латексные).

Ход работы:

1. Перед началом работы поместите в ламинарный бокс стерильные инструменты, посуду и материалы, необходимые для работы. Включить УФ-лампу. Через 15 минут выключите УФ и включите режим работы биофильтров.

2. Обработайте руки и рабочую поверхность ламинарного бокса 70%-ным раствором спирта. При работе со стерильной посудой и материалом помните о том, что нельзя проносить руки над открытой стерильной поверхностью.

3. Разлейте стерильную питательную среду по стерильным пробиркам и банкам. Для защиты рук при работе с горячими колбами со стерильной питательной средой используйте хлопчатобумажные перчатки.

Задание 2.4. Выполните практическую работу «Техника введения в культуру in vitro семян для получения асептических проростков».

Материалы и оборудование: сухие семена пшеницы (ржи, ячменя, тритикале), ламинарный бокс, чашки Петри со стерильной питательной средой, стаканчики, стерильные чашки Петри, автоклавированная фильтровальная бумага, автоклавированная дистиллированная вода, стерилизующие агенты (5-9%-ный раствор гипохлорида натрия, 10-12%-ный раствор пероксида водорода, KMnO_4), стерильные металлические инструменты, стерильные вспомогательные материалы, 70%-ный раствор этилового спирта, стерильные перчатки (по желанию латексные).

Ход работы:

1. Предварительно проведите ступенчатую дезинфекцию сухих семян пшеницы (ржи, ячменя, тритикале). Для этого промойте их мыльной водой и сполосните автоклавированной дистиллированной водой, а затем погрузите их на 20 минут в светло-розовый раствор KMnO_4 , с последующей его сменой на 70%-ный этанол и экспозицией в течении 1-2 минут. Все последующие процедуры проводите в ламинарном боксе.

2. Предварительно продезинфицированные семена поместите в стаканчики, содержащие по 30 мл различных стерилизующих растворов. Время стерилизации определите в зависимости от стерилизующей активности раствора (таблица 2.1). По истечении указанного времени слейте стерилизующие растворы и 3-хкратно промойте после деконтаминации семена автоклавированной дистиллированной водой.

Таблица 2.1 – Стерилизация растительного материала
(по Р.Г. Бутенко, 1990)

--	--

Объект	Время стерилизации			
	диацид, 0,1%-ный	сулема, 0,1%-ный	гипохлориты (Na, Ca) 5-9%-ный	пероксид водорода 10-12%-ный
Семена сухие	15-2	10-15	15-20	12-15
Семена набухшие	6-10	6-8	10-15	6-8

3. Осуществите проращивание семян в термостате при температуре 25°C двумя способами: на питательной среде Мурасиге–Скуга без гормонов и между слоями фильтровальной бумаги в стерильных чашках Петри в течение 4-6 суток.

4. Сравните эффективность разных способов стерилизации и проращивания семян. Определите процент инфицирования в результате неудовлетворительной стерилизации и процент прорастания семян.

5. Результаты оформите в виде таблицы 2.2.

Таблица 2.2 – Оценка эффективности разных способов стерилизации и проращивания семян

Стерилизующий агент	Способ проращивания семян	Эффективность стерилизации			Эффективность проращивания		
		общее количество семян, шт	количество стерильных семян, шт	% инфицирования	количество стерильных семян, шт	количество проросших семян, шт	% прорастания

6. Сделать вывод об эффективности использованных в работе стерилизующих агентов и эффективности разных способов проращивания семян.

Задание 2.5. Выполните практическую работу «Введения в культуру in vitro листовых эксплантов пшеницы».

Материалы и оборудование: 4–5-дневные проростки пшеницы, в которых листовые пластинки находятся в coleoptile; чашки Петри со стерильной питательной средой для индукции первичного callus; набор стерильных инструментов (пинцеты, скальпель); ламинарный бокс; термостат.

Ход работы:

1. Отделите от семян ростки, в которых листовые пластинки находятся в coleoptile и простерилизуйте 30%-ным раствором гипохлорита натрия в течение 10-15 минут, а затем промойте трижды автоклавированной дистиллированной водой.

2. Выделите листовые пластинки из coleoptiles и поместите на питательную среду.

3. Поместите чашки с листовыми эксплантами в термостат, поддерживающий температуру 22 °C.

4. Проведите через 2-4 недели визуальную оценку количественных (число листовых эксплантов, образовавших callus) и качественных (размер, цвет образовавшегося callus) параметров callusобразования. Опишите процесс образования callusной ткани.

5. Сделайте соответствующие выводы.

Вопросы и задания для самоконтроля

1. Чем отличается дезинфекция от стерилизации?
2. Каким образом осуществляется стерилизация посуды и инструментов для работы с растительными объектами в условиях in vitro?
3. Какие существуют способы стерилизации питательных сред, содержащих и не содержащих термолabile компоненты?
4. Каким образом осуществляется подготовка к работе ламинарного бокса и каковы основные правила работы в условиях ламинарного бокса?
5. Охарактеризуйте основные этапы проведения стерилизации растительных объектов.
6. Каково назначение основных компонентов питательных сред для культивирования растительных клеток и тканей?

7. Какие существуют типы питательных сред? Чем они различаются?
8. Что такое маточные растворы и как их готовят?
9. Какова роль фитогормонов в питательных средах для культивирования клеток и тканей?

Темы для реферативных сообщений

1. Гормональная регуляция прямого и непрямого путей морфогенеза.
2. Особенности ризогенеза и его гормональная регуляция.
3. Гормональная регуляция геммогенеза, стеблевого органогенеза.
4. Апикальное доминирование и его гормональная регуляция.

Практическое занятие 3

Применение фитогормонов в агротехнологиях

Задание 3.1. Выполните практическую работу «Микрклональное размножение пробирочных растений».

Материалы и оборудование: микрклоны растений (актинидия, жимолость, розы); колбы со стерильной питательной средой с различной концентрацией цитокининов и ауксинов; набор стерильных инструментов (пинцеты, скальпель); ламинарный бокс; камера для роста растений.

Ход работы:

1. В стерильных условиях ламинар-бокса разделите исходный побег растения на фрагменты с двумя и более пазушными почками.
2. Перенесите с помощью пинцета фрагменты побегов на приготовленные питательные среды с различным содержанием фитогормонов
3. Проведите на 21-й день визуальные наблюдения за развитием пазушных и адвентивных побегов.
4. Результаты оформите в виде таблицы 3.1.

Таблица 3.1 – Оценка влияния различных концентраций цитокининов в сочетании с ауксинами на побегообразование разных видов растений

Вид растения	Концентрация фитогормонов	Общее количество эксплантированных побегов, шт	Развитие пазушных побегов		Развитие адвентивных побегов	
			кол-во, шт	%	кол-во, шт	%

5. Сделайте соответствующие выводы.

Задание 3.2. Выполните практическую работу «Выделение и культивирование апикальных (пазушных) меристем картофеля».

Материалы и оборудование: пророщенные клубни картофеля; стерильные чашки Петри; пробирки со стерильной питательной средой; набор стерильных инструментов (пинцеты, скальпель); ламинарный бокс, стереоскопический микроскоп.

Ход работы:

1. Отделите от клубней ростки и простерилизуйте 50 %-ным раствором гипохлорита натрия в течение 10–15 минут, а затем промойте трижды автоклавированной дистиллированной водой.
2. Вычлените под биноклем апикальную или боковую меристемы, последовательно снимая кроющие листочки. Стерильные ростки поместите в стерильную чашку Петри.
3. Перенесите меристемы размером 100-250 мкм без примордиев на острие скальпеля на питательную среду в пробирку.
4. Проведите в течение 10-14 дней визуальные наблюдения и опишите процесс образования

каллусной ткани. Для характеристики каллусов используйте такие параметры, как размер, цвет и плотность каллуса, число отзывчивых эксплантов к культивированию в условиях *in vitro*.

5. Сделайте соответствующие выводы.

Вопросы и задания для самоконтроля

1. Что такое тотипотентность?
2. В чём преимущество микроклонального размножения по сравнению с вегетативным размножением растений?
3. Что такое дедифференцировка клеток и почему она является основой каллусогенеза? Какие гормоны являются индукторами дедифференцировки?
4. Назовите морфофизиологические особенности каллусных клеток.
5. Каковы причины генетической неоднородности каллусных клеток и как ее можно использовать в биотехнологии?
6. Какие способы культивирования каллусных клеток вы знаете?
7. Как можно индуцировать различные типы органогенеза в культуре каллусных тканей?
8. Что вам известно о генетических и эпигенетических основах морфогенеза?
9. Какие виды клеточных технологии *in vitro* в селекции растений вы знаете? Каковы их задачи?

Темы для реферативных сообщений

1. Роль фитогормонов в реализации явления тотипотентности в культуре *in vitro*.
 2. Соматическая изменчивость в культуре *in vitro*.
 3. Проблемы, связанные с микроклональным размножением растений.
 4. Соматическая гибридизация и практические области ее применения.
 5. Роль микроклонального размножения растений в оздоровлении посадочного материала (на примере картофеля).
-

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

РАСТИТЕЛЬНЫЕ ТКАНИ

1. Одним из общих свойств фитогормонов является то, что:

- А) гормоны имеют полипептидную природу; Б) гормоны вызывают физиологический ответ в диапазоне концентраций 10^{-13} – 10^{-5} моль/л;
В) место синтеза и место действия гормона не разобщены между собой.
Г) гормоны обладают узкой специализацией.
-



ВОПРОСЫ К ЗАЧЕТУ

1. Обзор фитогормонов. Принципы функционирования.
 2. Рецепторы гормонов. Системы передачи гормональных сигналов.
 3. Ауксины. Полярный транспорт, рецепция и передача сигнала. Роль в развитии растения.
 4. Цитокинины. Транспорт, рецепция и передача сигнала. Роль в развитии растения.
 5. Этилен. Транспорт, рецепция и передача сигнала. Роль в развитии растения.
 6. Гиббериллины. Транспорт, рецепция и передача сигнала. Роль в развитии растения.
 7. Абсцизовая кислота. Транспорт, рецепция и передача сигнала. Роль в развитии растения.
 8. Гормональная регуляция дедифференцировки растительной клетки в условиях *in vitro*.
 9. Фитогормональная индукция каллусогенеза в условиях *in vitro*.
 10. Взаимодействие фитогормонов и управление морфогенезом каллусов в условиях *in vitro*.
 11. Гормональная регуляция побегообразования в условиях *in vitro*.
 12. Гормональная регуляция ризогенеза в условиях *in vitro*.
 13. Исследование действия фитогормонов на модельных системах в условиях *in vitro*.
 14. Гормональная регуляция регенерации при микроклональном размножении растений.
 15. Фитогормоны и синтетические регуляторы роста в растениеводстве.
 16. Регуляция устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессам.
-

Список рекомендуемой литературы

Основная

1. Волосюк, С. Н. Физиология растений : учеб.-метод. комплекс / сост.: С. Н. Волосюк, В. И. Бойко. – Брест : БрГУ имени А.С. Пушкина, 2021. – 218 с.
2. Генетика развития растений / Л. А. Лутова [и др.]; ред. С. Г. Инге-Вечтомов. – 2-е изд. перераб. и доп. – СПб. : Изд-во Н-Л, 2010 – 432 с.
3. Коничев, А. С. Молекулярная биология : учебник / А. С. Коничев, Г. А. Севастьянова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : Академия, 2012. – 400 с.
4. Ленивко, С. М. Технология введения в культуру и методы культивирования клеток, тканей, органов растений на примере пшеницы : методические рекомендации / С. М. Ленивко. – Брест : БрГУ, 2013. – 46 с.
5. Мушкамбаров, Н. Н. Молекулярная биология. Введение в молекулярную цитологию и гистологию : учеб. пособие / Н. Н. Мушкамбаров, С. Л. Кузнецов. – Изд. 3-е, испр. и доп. – М. : Медицинское информационное агентство, 2016. – 664 с.
6. Рост, развитие и основы биотехнологии растений : ЭУМК. № УД-276 / Т. И. Дитченко. – Режим доступа : <http://elib.bsu.by/handle/123456789/106310>

Дополнительная

1. Бойко, В. И. Физиология растений : учеб.-метод. комплекс : в 2 ч. / автор-сост.: В. И. Бойко, С. Н. Волосюк. – Брест : БрГУ им. А.С. Пушкина, 2014 – Ч. 1 : [Б. з.]. – 2014. – 141 с.
2. Бойко, В. И. Физиология растений : учеб.-метод. комплекс : в 2 ч. / автор-сост.: В. И. Бойко, С. Н. Волосюк. – Брест : БрГУ им. А.С. Пушкина, 2014 – Ч. 2 : [Б. з.]. – 2017. – 122 с.
3. Ботаника и физиология растений : учеб. пособие / С. В. Лазаревич [и др.]. – Ростов н/Д : Феникс, 2015. – 432 с.
4. Ботаника : учебник / ред.: Г. П. Яковлев, М. Ю. Гончаров. – Изд. 4-е, испр. и доп. – СПб. : СпецЛит, 2018. – 879 с.
5. Методики проведения биологических исследований и оформление их результатов : метод. рекомендации / сост. М. П. Жигар [и др.]. – Брест, БрГУ, 2014. – 57 с.
6. Решетников, В. Н. Информационные структуры растительной клетки : курс лекций / В. Н. Решетников, Е. В. Спиридович. – Минск : БГУ, 2008. – 103 с.
7. Якушкина, Н. И. Физиология растений : учебник / Н. И. Якушкина, Е. Ю. Бахтенко. – М. : ВЛАДОС, 2005