

## КОМПЕТЕНТНОСТЬ ОБЪЕКТОВ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ И ГЕННО ИНЖЕНЕРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ – КРАЕУГОЛЬНЫЙ ПРИНЦИП ЭФФЕКТИВНОСТИ

Липский Александр Хемович

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Ордена Трудового  
Красного Знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН»,  
Россия, г. Ялта  
[al6749@mail.ru](mailto:al6749@mail.ru)

Одна из принципиальных основ научного эксперимента – искусство выбора (создания) объекта исследования. Постулат о тотипотентности клеток растений не отменяет общеизвестного факта ограниченного типа тканей и органов растений, клетки которых сохраняют в онтогенезе потенциал для дедифференциации, каллусообразования и регенерации целых растений. Эта проблема особенно актуальна для хозяйственно ценных видов. Опыт собственных исследований по повышению компетентности клеток для генетической модификации и масштабированию клонального микроразмножения может оказаться полезными в аналогичных работах.

Для целей генетической трансформации из сегментов чешуй луковиц *Lilium longiflorum* cv. Snow Queen были получены проэмбриогенные каллусные ткани в Центре с.-х исследований Волкани, Бейт Даган, Израиль. Полученные из этих тканей глубинные культуры в колбах на качалке, после трех укороченных циклов периодического культивирования без вхождения в стационарную фазу роста, имели 50–70 кратное повышение содержания клеток компетентных к генетической трансформации по сравнению с исходными каллусными культурами. На стадии регенерации из культур клеток, выращенных таким способом, было получено  $81,6 \pm 3,7$  пробирочных растений на грамм сырой биомассы. Этот же прием культивирования оказался эффективным при попытке получения регенерантов трансгенных растений из каллусных культур, поддерживавшихся десять лет в пересадочной культуре, без признаков морфогенеза. В другой серии исследований для целей генетической трансформации были получены проэмбриогенные каллусные ткани из трех гибридных линий птицемлечника (*Ornithogalum dubium*: ATD и 95/49/60; *O. thyrsoides*: 00/36/1). Введение этих линий культур каллусных тканей в глубинную культуру и применение трех укороченных циклов периодического культивирования также повышало количество клеток компетентных к генетической трансформации и уровень соматического эмбриогенеза. Для этих линий было обнаружено значительное различие интенсивности деления клеток, а также критической массы агрегатов клеток для инициации соматического эмбриогенеза. В результате продолжительность экспериментов по получению регенерантов для двух линий *O. dubium* составляли 4–6 месяцев, а для *O. thyrsoides* до 12 месяцев.

В экспериментах с 4 сортами винограда проэмбриогенные каллусные культуры были получены из незрелых пыльников в лаборатории д-ра А. Перла. Использование этих культур каллусов позволило получить суспензионные культуры клеток и тканей. Из таких суспензионных культур были отселектированы линии, отличавшиеся высокой компетентностью к генетической трансформации и повышенным регенерационным потенциалом.

Глубинные культуры почек гладиолуса были получены в колбах на качалке в Отделе, возглавлявшемся чл.-корр. АН СССР Р. Г. Бутенко, Института физиологии растений РАН, им. К. А. Тимирязева, Москва. Культуры были получены из клубнелуковиц в жидкой питательной среде с использованием ретарданта – паклобутразол. Культуры почек характеризовались разрастанием крупных агрегатов до 15–20 мм диаметром в конце периодического цикла выращивания. Для подготовки инокулюма агрегаты разделяли механически до 3–5 мм. Гистологические исследования этих тканей показали наличие структур аналогичных пазушной почке, обеспечивавших их высокий регенерационный потенциал.

**Ключевые слова:** глубинные культуры клеток и тканей, компетентные клетки, регенерационный потенциал, соматический эмбриогенез.

---

## A COMPETENCE OF BIOTECHNOLOGY AND GENETIC ENGINEERING RESEARCH OBJECTS ARE THE MILSTONE OF AN EFFICIENCY

**Lipsky Alexander Khemovich**

*Federal State Funded Institution of Science "The Labor Red Banner Order Nikita Botanical Gardens – National Scientific Center of the RAS", Yalta, Russian Federation*

[al6749@mail.ru](mailto:al6749@mail.ru)

One of the fundamental bases of a scientific experiment is the art of choosing (creating) an object of study. The postulate of totipotency of plant cells does not reject the well-known fact of a limited type of plant tissues and organs, whose cells retain in ontogenesis the potential for dedifferentiation, callus formation and regeneration of whole plants. This problem is especially relevant for economically valuable species. The experience of our own research on increasing the competence of cells for genetic modification and scaling up clonal micropropagation may be useful in similar studies. For the purposes of genetic transformation from bulb scale segments of *Lilium longiflorum* cv. Snow Queen proembryogenic callus tissues were obtained at the Volcani Center, ARO, Beit Dagan, Israel. The submerged cultures obtained from these tissues in shake flasks, after three shortened cycles of batch cultivation without entering in stationary phase of growth, had a 50–70-fold increase in the content of competent cells for genetic transformation compared to the original callus cultures. At the regeneration stage, 81.6–3.7 plantlets in test-tubes per gram of fresh biomass were obtained from cell cultures grown by this method. The same cultivation technique proved was effective when trying to obtain transgenic plant regenerants from callus cells after ten years of subculture without feature of morphogenesis.

In another series of studies, proembryogenic callus tissues were obtained for genetic transformation purposes from three hybrid lines of Star of Bethlehem (*Ornithogalum dubium*: ATD and 95/49/60; *O. thyrsoides*: 00/36/1). The introduction of these lines of callus tissue cultures into submerged culture and the use of three shorter cycles of batch cultivation also increased the number of cells competent for genetic transformation and the level of somatic embryogenesis. For these lines, a significant difference was found in the intensity of cell division, as well as in the critical mass of cell aggregates for the initiation of somatic embryogenesis. As a result, the duration of experiments on obtaining regenerants for two lines of *O. dubium* was 4–6 months, and for *O. thyrsoides*, up to 12 months. In experiments with 4 grape varieties, proembryogenic callus cultures were obtained from immature anthers in the Laboratory of Dr. A. Pearl. The use of these callus cultures made it possible to obtain suspension cultures of cells and tissues. From such suspension cultures, lines were selected that were distinguished by high competence for genetic transformation and increased regenerative potential.

Submerged gladiolus bud cultures were obtained in shake flasks in the Department, headed by Prof. R.G. Butenko, Timiryazev Institute of Plant Physiology, RAS, Moscow. The cultures were obtained from corms in a liquid nutrient medium using retardate – paclobutrazol. The bud cultures were characterized by the growth of large aggregates up to 15–20 mm in diameter at the end of the periodic cultivation cycle. To prepare the inoculum, the aggregates were divided mechanically up to 3÷5 mm. Histological studies of these tissues showed the presence of structures like axillary bud, which ensured their high regenerative potential.

*Keywords:* submerged cultures, competent cells, regeneration potential, somatic embryogenesis.