УДК 581.08:573.6

БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕЕ РАЗВИТИЯ

В.Н. РЕШЕТНИКОВ[1], Е.В. СПИРИДОВИЧ[1], А.М. НОСОВ[2]

[1]Государственное научное учреждение «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси»
220012 Минск, ул. Сурганова, 2В
e-mail: A.spiridovich@cbg.org.by
[2]Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук
127276 Москва, ул. Ботаническая, 35
e-mail: al_nosov@mail.ru

В обзоре приведена характеристика современных биотехнологий растений, дан анализ их состояния и направлений развития. Основное внимание уделено биотехнологиям, направленным на создание коллекций для сохранения и рационального использования биоразнообразия растений, совершенствование селекционного процесса, создание новых форм, а также обеспечение потребностей медицины в возобновляемом растительном сырье и биологически активных веществах растительного происхождения.

Ключевые слова: биотехнология растений, культура клеток и тканей высших растений, производство биологически активных веществ.

Основные направления развития биотехнологии растений охватывают широкий круг задач, в том числе — ускоренного производства высококачественного посадочного материала сельскохозяйственных, лесных и декоративных культур, а также получения возобновляемого растительного лекарственного сырья и биологически активных веществ (БАВ) растительного происхождения для современной медицины [21].

Отличительной чертой современной биотехнологии растений является то, что практически все ее разделы основаны на использовании растительных объектов in vitro. Это могут быть стерильные пробирочные растения, культуры органов, тканей или клеток растений, а также изолированные протопласты.

Биотехнологию растений можно разделить на две большие группы: технологии, конечным продуктом которых являются интактные растения, и технологии, конечным продуктом которых являются биомасса культур клеток и (или) вещества растительного происхождения.

По областям применения биотехнологию растений можно классифицировать на технологии, используемые для глобальных (экологических) целей, растениеводческие (прежде всего сельскохозяйственные) и промышленные.

Для экологических целей применяются прежде всего биотехнологические коллекции, предназначенные для хранения и реинтродукции редких и исчезающих видов растений. С этой целью используются коллекции пробирочных растений как пересадочных, так и депонированных при пониженных температурах, а также коллекции меристем и морфоген-

© В.Н. РЕШЕТНИКОВ, Е.В. СПИРИДОВИЧ, А.М. НОСОВ, 2014

ных культур клеток, в том числе криоколлекции, в которых объекты хранятся в жидком азоте. Особое значение биотехнологические коллекции имеют для сохранения видов, которые плохо размножаются семенами.

В настоящее время биотехнология применяется для решения проблем сохранения биологического разнообразия — глобальной мировой задачи. Разработка биотехнологических методов размножения растений, создание генетических банков и коллекций культур клеток играют важную роль в сохранении генофонда дикорастущих редких и исчезающих видов. На стыке биотехнологии и охраны дикой природы сформировалась современная наука — биотехнология охраны растений (Plant Conservation Biotechnology), которая не заменяет классических методов ex situ и in situ консервации, а предоставляет дополнительные приемы, способствующие управлению генетическими ресурсами редких растений, включающие методы культуры тканей, молекулярно-генетический анализ, создание банков семян, ДНК, криоконсервацию и др. [29].

Наиболее массовую группу составляют растениеводческие биотехнологии. Они отличаются самым широким набором используемых растительных объектов — от пробирочных растений до протопластов, направлены на получение новых форм растений, облегчение селекционного процесса, эффективное размножение и оздоровление ценных генотипов.

К первой, наиболее многочисленной группе технологий относятся биотехнологии получения гаплоидов и удвоенных гаплоидов (андрогенез, гиногенез), получение и культивирование гибридных зародышей (преодоление постгамной и предгамной несовместимости), различные методы клеточной селекции, в том числе с использованием сомаклональной вариабельности, соматическая гибридизация и, наконец, генетическая инженерия растений.

Вторая группа биотехнологий растений представлена различными способами их микроклонального размножения и оздоровления.

Промышленные биотехнологии направлены на получение в промышленных условиях продуктов растительного происхождения. В качестве объектов они используют культуры клеток растений, реже — культуры органов (прежде всего корней, в том числе трансформированных).

Ниже приведена краткая характеристика и дан анализ состояния основных направлений современной биотехнологии растений, при этом основное внимание уделено биотехнологиям, направленным на обеспечение потребностей медицины в возобновляемом растительном сырье и БАВ растительного происхождения.

Биотехнологические коллекции растительных объектов. Многие лекарственные растения относятся к редким или исчезающим видам, поэтому биотехнологические коллекции представляют большую ценность не только для экологических целей (сохранение видов), но и имеют огромное экономическое значение.

Клетки «вне организма» можно сохранять как в живой пересадочной коллекции, так и депонировать (хранить) их при низких и сверхнизких температурах (в жидком азоте).

Существуют два принципиально различных подхода к коллекциям растительных объектов. Если важно сохранить уникальные генотипы (ценные сорта или разновидности растений), то нельзя допускать образования популяций клеток in vitro, т. е. возникновения каллюсных культур (иначе в результате сомаклональной вариабельности могут потеряться ценные свойства сорта). В этом случае в качестве объектов хранения

следует использовать пробирочные растения, органы или ткани растений [16, 63].

При необходимости сохранения не конкретного генотипа, а генофонда вида в качестве объектов хранения можно использовать морфогенные или эмбриогенные культуры клеток. В качестве примера приведем криосохранение в коллекции Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук (ИФР РАН) эмбриогенных культур клеток эндемичных видов диоскорей — кавказской (исчезающий вид) и балканской (*Dioscorea caucasica* Lipaky и *D. balcanica* Kosanin). После криоконсервации культуры полностью сохранили способность к соматическому эмбриогенезу, из них были получены растения-регенеранты.

В ряде зарубежных стран сформированы и эффективно функционируют коллекции клеток, органов и растений, культивируемых in vitro. Кроме того, организованы криобанки, где в жидком азоте хранятся образцы растительного материала, принадлежащего к разным систематическим группам. Многие коллекционные образцы, сохраняемые как национальное достояние, относятся к разряду редких и исчезающих растений, охраняемых законом.

В США (штат Орегон, Корваллис) функционирует National Clonal Germplasm Repository USDA [54], где хранится 500 000 образцов хозяйственно-ценных, а также редких и исчезающих растений, охватывающих 10 000 видов. В коллекции Корваллиса хранится in vitro ряд лекарственных растений, например три вида шлемника: *Scutellaria baicalenisis* Georgi, *S. lateriflora* L., *S. racemosa* Pers [33].

Из европейских коллекций следует отметить германскую, в которой поддерживают более 700 образцов различных линий культур клеток, принадлежащих к 80 различным семействам растений, причем большинство этих культур синтезируют фармакологически важные вторичные метаболиты [32]. Подобные коллекции существуют во Франции, Италии, Испании, Бельгии, Польше, Румынии, Японии, Индии, ряде других стран [50].

Российская коллекция культур клеток, учрежденная в 1978 г., в настоящее время включает 9 разделов, в том числе 2 специализированные коллекции клеток высших растений и генетически трансформированных корней растений ИФР РАН [13], которые насчитывают около 100 различных штаммов и линий культур клеток [7].

В 2005 г. Центральный ботанический сад НАН Беларуси получил свидетельство на коллекцию асептических культур хозяйственно-полезных растений. Постоянно пополняясь, эта коллекция сегодня содержит 241 наименование растений: 32 вида и более 200 культиваров из 11 семейств. При этом более 65 % таксонов в ее составе относится к фиторесурсным видам. Наиболее полно представлены семейства Ericaceae Juss. и Orchidaceae Juss., отдельные представители которых внесены в списки CITES и Красную книгу Республики Беларусь [23, 25].

Часто депонирование образцов в коллекциях осуществляется помещением растительного материала в условия, тормозящие рост, деление и метаболизм его клеток, что позволяет реже менять питательные среды и тем самым существенно сокращать затраты на содержание коллекций вегетативно размножающихся растений [28, 42]. Этот прием широко используется во всем мире, поскольку дает возможность эффективно сохранять практически все клоны и сорта ценных плодовых, ягодных, декоративных и лекарственных культур [1, 61].

Однако культивирование in vitro клеток, тканей и органов растений с помощью периодических пересадок на свежие питательные среды даже в режиме депонирования имеет свои проблемы и недостатки, связанные прежде всего с существованием некоторой вероятности потери образцов из-за реинфицирования, генетических изменений и даже утраты морфогенного потенциала и жизнеспособности [62]. Расходы на содержание растущих коллекций растений in vitro многократно повышаются с увеличением продолжительности хранения образцов [55].

В связи с этим для снижения затрат на долговременное содержание коллекций ценного растительного материала, в том числе и культивируемого in vitro, и для уменьшения вероятности потерь ценных образцов в настоящее время в странах-членах FAO, включая и Российскую Федерацию, широко используют криосохранение [36, 61]. На сегодня разработаны методы криосохранения более 200 видов растений: семян и тканей, культивируемых in vitro [35].

Криобанк отдела биологии клетки и биотехнологии ИФР РАН организован более 30 лет назад, он стал одним из первых в мире. Первым разработан метод криосохранения меристем картофеля. К настоящему времени кроме меристем картофеля в нем хранятся меристемы около 30 сортов земляники, нескольких сортов малины и черной смородины [17].

Основными проблемами долговременного культивирования и сохранения растительных объектов являются [34, 37]: наличие в некоторых образцах сохраняемого материала, после его введения в культуру in vitro, условно патогенной (сопутствующей) микрофлоры, в том числе и латентных микроорганизмов [57, 66, 69]; вероятность изменений свойств сохраняемого растительного материала в процессе его длительного культивирования in vitro или хранения в жидком азоте; снижение жизнеспособности из-за изменений температуры при передвижении или переносе криосохраняемых образцов [58]; генетические изменения [24, 39, 40, 43]; реинфицирование [30, 31, 52, 57, 68]; биохимические изменения [14, 33].

Использование биотехнологических методов для облегчения селекционного процесса и создания новых форм. Создание генетического разнообразия — обязательный начальный этап любых селекционных программ. Традиционными способами расширения генетического разнообразия являются внутривидовая и отдаленная гибридизации. Для стабилизации гибридных линий требуется 5—7 лет самоопыления. В результате создание нового сорта занимает в среднем 10—12 лет. Мечта каждого селекционера — иметь для работы полностью гомозиготное растение, в этом случае в поколениях не будет происходить расщепление, и селекционный процесс существенно сократится.

В 1964 г. индийские исследователи Гуха и Магешвари открыли возможность получения in vitro гаплоидов при культивировании пыльников. Гаплоидные растения развивались из незрелых пыльцевых зерен. Было установлено, что развитие пыльцевых зерен в условиях in vitro может происходить по спорофитному пути, в частности, они могут делиться и образовывать соматические эмбриоиды, а поскольку клетки пыльцы гаплоидны, то и соматические эмбриоиды тоже будут состоять из гаплоидных клеток. В дальнейшем, при удвоении числа хромосом, происходящем спонтанно или индуцированном обработкой колхицином, возникают гомозиготные диплоидные растения, которые передают свои признаки потомству без расщепления. Таким образом, используя пыльники гибридов F_1, стабильные линии можно получать на 3—4 года быстрее, чем при традиционном способе. Процесс получения растений из

пыльцы назвали андрогенезом. Впоследствии были подобраны условия создания гаплоидных растений и из семязачатков (неоплодотворенных семяпочек). Этот способ производства гаплоидных растений получил название гиногенез [2, 19].

Метод андрогенеза широко применяется в селекции злаковых и овощных культур. В разных странах на основе использования культуры пыльников созданы высокоурожайные и устойчивые к неблагоприятным факторам сорта. Например, в Китае андрогенетические сорта пшеницы занимают площадь 70 тыс. га, риса — 10 тыс. га. В России на основе метода андрогенеза созданы улучшенные высокоурожайные сорта риса (Краснодарский край, НИИ риса РАСХН), пшеницы (Краснодарский НИИ сельского хозяйства РАСХН), ячменя (Саратовский институт сельского хозяйства Юго-Востока РАСХН), моркови (ВНИИССОК РАСХН, Московская обл.), проса (ВНИИ зернобобовых и крупяных культур РАСХН, Орел).

Значительные работы в этом направлении проводятся в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси, где в культуре пыльников in vitro получены линии удвоенных гаплоидов ярового гексаплоидного тритикале, а также изучаются механизмы гаметоклональной изменчивости и особенности наследования признаков андрогенеза in vitro [11, 12].

При отдаленной гибридизации нередко возникает проблема несовместимости родительских геномов — гибридные зародыши погибают на разных стадиях развития. Причинами их гибели могут быть отрицательное влияние тканей родительского растения на зародыш или хромосомный дисбаланс. В первом случае изоляция зародыша на возможно более ранних стадиях развития и доращивание его на питательной среде в условиях in vitro — эффективное средство спасения отдаленного гибрида. Этот биотехнологический метод, получивший название эмбриокультура, широко применяется в селекции зерновых, бобовых и плодовых растений. Если же у отдаленных гибридов несбалансирован хромосомный набор, можно получать каллюсные ткани из гибридного зародыша. Культивирование клеток in vitro способствует хромосомной рекомбинации, что повышает возможность выявления жизнеспособных клеток. Растения, регенерированные из каллюсной ткани гибридов, обычно сохраняют большую часть генетического материала одного из родителей и отдельные фрагменты хромосом другого. Заново скомбинированный геном становится стабильным и обеспечивает жизнеспособность растения [14, 16].

Уникальным и эффективным способом повышения генетического разнообразия является использование сомаклональной вариабельности. Известно, что культивирование клеток растений in vitro способно вызывать не меньшие перестройки генома, чем химические мутагены или различные виды излучений. Возникшие в культивируемых клетках мутации сохраняются у регенерированных из этих клеток растений. Для повышения степени генетического разнообразия можно дополнительно использовать индуцированный мутагенез [9]. Как и индуцированный мутагенез, сомаклональная изменчивость не является направленной, и большая часть возникающих в процессе культивирования вариаций не имеет практического значения. Однако среди сомаклонов (измененных растений-регенерантов) можно отобрать индивиды с полезными признаками. Например, среди сомаклонов сахарного тростника отобраны растения, устойчивые к вирусу Фиджи, желтой пятнистости и ложной мучнистой росе. Учеными Венгрии выделены сомаклоны пшеницы,

обладающие повышенной холодостойкостью. Сомаклоны лекарственных растений с повышенным биосинтезом БАВ получены в Украине [9] и в Беларуси [3].

В отличие от гибридизации, культивирование клеток in vitro не разрушает ценного сочетания генов, достигнутого в результате предыдущей селекции. Вариации затрагивают лишь отдельные участки генома. По этой причине сомаклональную изменчивость обычно используют для улучшения отдельных признаков у существующих сортов.

Эффективность отбора культивируемых клеток и тканей с необходимыми признаками существенно возрастает при использовании клеточной селекции, т. е. при выращивании клеток в селективных условиях, например на питательных средах, содержащих токсические концентрации солей (для получения солеустойчивых вариантов), гербицидов (для получения культур, устойчивых к ним), продуктов жизнедеятельности фитопатогенных микроорганизмов (для получения вариантов, устойчивых к фитопатогенам). В этом случае появляется возможность на основе сомаклональных вариаций отобрать в жестких селективных условиях клетки, характеризующиеся искомым признаком.

Проведение селекции in vitro дает возможность выявлять миллионы генотипов, не занимая посевных площадей и вне зависимости от сезона и погоды.

Для многих видов культурных растений методом клеточной селекции получены формы, обладающие повышенной устойчивостью к засолению, засухе, экстремальным температурам, кислым почвам, различным болезням и вредителям. В результате отбора на средах с токсическими аналогами аминокислот выделены растения с повышенным содержанием белка или содержащие белок, обогащенный ценными аминокислотами.

Методом совместного культивирования in vitro растений с пораженными тканями и зооспорангий патогенов разработаны системы для отбора клеток и растений, устойчивых к возбудителям рака картофеля и парши обыкновенной. Кроме того, для повышения эффективности клеточных технологий использован ряд стрессовых факторов, таких как высокие температуры, осмотический стресс, NaCl, УФ-облучение [4].

Генетическая инженерия в настоящее время является самым бурно развивающимся разделом биотехнологии растений. Суть ее состоит во введении нужного гена (генов) — часто их называют «генами интереса» — в растительный организм. «Гены интереса» могут иметь различное происхождение (из бактерий, грибов, организмов животных или даже синтетические) и определять разные свойства (гены устойчивости растения к биотическим и абиотическим стрессовым факторам, синтеза ценных белков и др.) [20].

Система создания генетической конструкции, ее введения в организм является предметом отдельного исследования. Скажем лишь, что практически всегда для генно-инженерных работ используют объекты in vitro. Важнейшим фактором, обеспечивающим успех этих работ, является эффективная технология регенерации растений. К настоящему времени в создании трансгенов уже достигнут значительный прогресс. Получены трансгенные растения с генами, определяющими их устойчивость к гербицидам, фитопатогенным микроорганизмам, насекомым-вредителям, растения, устойчивые к неблагоприятным условиям внешней среды, с улучшенными внешним видом и пищевыми свойствами [8, 10].

На сегодня в мире созданы трансгенные растения более чем 80 сельскохозяйственных культур, среди которых важнейшие зерновые культуры — пшеница, рис, кукуруза; овощные культуры — томаты, картофель, сладкий перец; масличные культуры — соя, рапс. Чтобы представить себе масштабы работ в области создания трансгенных растений, достаточно упомянуть, что к концу прошлого века в 45 странах (преимущественно в США, Канаде, странах Западной Европы) было проведено свыше 25 000 полевых испытаний 60 различных сельскохозяйственных культур. Наиболее часто вводимые новые признаки: устойчивость к гербицидам, насекомым, вирусам, грибам, бактериальной инфекции, улучшенные пищевые качества растения [8, 10].

Подобные работы проводятся в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси, где созданы две генетические конструкции векторов с бактериальным геном *gox*, экспрессирующим фермент глюкооксидазу, побочным продуктом которой является пероксид водорода, способный подавлять активность фитопатогенов. Методом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации полученные векторы введены в растения картофеля отечественной селекции сорта Скарб. Ожидается, что экспрессия глюкозооксидазы у полученных трансформантов приведет к повышению устойчивости картофеля к неблагоприятным факторам и фитопатогенам. В отделе биохимии и биотехнологии растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси создана технология *Agrobacterium*-опосредованной трансформации in vitro и in planta клевера лугового, разработана технология получения трансгенных растений клюквы крупноплодной, экспрессирующих гетерологичный ген белка тауматина II с проявлением антигрибной активности и изменением вкуса плодов [21, 25].

Вместе с тем следует отметить и потенциальные опасности широкого внедрения генно-инженерных работ в сельское хозяйство. Дело в том, что трансгенное растение представляет собой новый организм с новыми свойствами. Может случиться, что эти свойства будут вредны для человека (например, при употреблении этого растения в пищу) или экосистемы (например, ген устойчивости к насекомым передастся многим растениям, что может привести к гибели популяции насекомых). Для выяснения безопасности трансгенных растений (кстати, не только растений, но всех генно-модифицированных организмов — ГМО) необходимы длительные многоплановые исследования. Причем именно длительные, поскольку последствия могут проявиться в поколениях как ГМО, так и использующих их организмов. Аргументы против подобных испытаний (например, «любой гибрид — это тоже генно-модифицированный организм»), как правило, некорректны (в частности, гибриды образуются в результате обмена блоками информации, тогда как вносимый ген встраивается в хромосому неконтролируемо и способен нарушить работу генома, что может проявиться не сразу). Поэтому, не отрицая важность и эффективность использования трансгенных организмов в практике, следует признать необходимым строгий контроль за их использованием, тщательное и всестороннее исследование их безопасности и обязательное маркирование всех трансгенных продуктов, поступающих на рынок [10, 20].

Быстрое и эффективное размножение ценных генотипов (микроклональное размножение). После отбора удачных генотипов встает проблема их сохранения и активного размножения. На основании изучения морфогенеза in vitro создана технология микроклонального размножения

растений, которая во многих странах стала успешной коммерческой областью сельского хозяйства.

Микроклональное размножение растений можно производить разными способами, из которых наиболее распространены: микрочеренкование пробирочных растений; индукция образования микроклубней и микролуковиц; изоляция почек или меристем с последующим их культивированием на средах с фитогормонами и индукцией побегообразования.

Преимущества микроклонального размножения по сравнению с традиционными методами состоят в значительно более высоком коэффициенте размножения (при микроклональном размножении можно получить до 100 тыс. растений в год, тогда как при обычном — 5—100 растений за тот же период); в миниатюризации процесса, приводящей к экономии площадей, занятых маточными и размножаемыми растениями; в размножении и укоренении растений, которые совсем не размножаются или плохо размножаются обычным методом.

Принципиально важно, что микроклональное размножение часто сопровождается оздоровлением растений. Небольшой размер эксплантата (часть растения, используемая как исходный материал), применяемого для микроклонального размножения, его поверхностная стерилизация, асептическое (стерильное) культивирование на стерильных питательных средах в условиях, исключающих инфицирование, оздоравливает получаемые растения от нематод и бактериальных патогенов. В сочетании с термо- и химиотерапией метод микроклонального размножения дает возможность в значительной степени избавиться и от вирусов, вироидов и микоплазм.

Он широко используется для получения большого количества посадочного материала декоративных и овощных культур. Это превосходный метод вегетативного размножения ценных гибридных растений, позволяющий сохранить эффект гетерозиса. В ряде стран, в том числе России и Беларуси, существуют промышленные технологические линии по размножению цветочных культур и других растений методами культуры in vitro.

Метод микроклонального размножения может быть весьма полезен для получения ценных лекарственных и новых хозяйственно-ценных растений [12, 16, 23].

Биотехнологии получения БАВ растительного происхождения. Использование растений и БАВ растительного происхождения в современной медицине постоянно возрастает. При этом наибольший интерес представляют препараты с противоопухолевой активностью, средства, повышающие продолжительность и качество жизни (адаптогены, биостимуляторы, в том числе иммуностимуляторы), а также кардиологические и противомикробные препараты [15, 27, 51, 60, 64]. В связи с этим возникает потребность в возобновляемых источниках БАВ растительного происхождения. Сбор растений в дикой природе представляет существенную опасность для сохранения видов. Плантационное выращивание часто нерентабельно, большой проблемой при этом является получение исходного посадочного материала, особенно для видов, плохо размножающихся семенами.

Культура клеток высших растений может служить альтернативным способом получения растительного сырья для медицины, ветеринарии, парфюмерии и пищевой промышленности. Суть его состоит в получении биомассы культуры клеток растений в стерильных условиях в биореакторах большого объема [5, 18]. Преимущества такого использования культур клеток достаточно ощутимы: практически абсолютная экологическая чистота процесса выращивания культуры клеток; гарантирован-

ное получение растительной биомассы с заданными характеристиками независимо от сезона, климатических и погодных условий; высокая скорость получения биомассы — до 2 г сухой биомассы с 1 л среды в сутки (для сравнения: прирост корня женьшеня на плантации — 1—2 г в год); гарантированное отсутствие в биомассе пестицидов, гербицидов, радиоактивных соединений и других загрязнителей; возможность использования для получения биомассы стандартного оборудования микробиологических производств (биореакторов, постферментационных систем и др.).

В ряде случаев биомасса клеток in vitro превосходит по свойствам природное или плантационное растение. Культура клеток оказывается незаменимой в случае редких, исчезающих или тропических видов лекарственных растений (табл. 1).

Для создания биотехнологического производства фармацевтической продукции растительного происхождения на основе биомассы культур клеток важны такие принципиальные моменты, как получение штамма-продуцента, оптимизация роста штамма и синтеза целевого продукта.

Получение штамма-продуцента. Далеко не всегда свободноживущие клетки растений in vitro синтезируют требующиеся вещества в нужном количестве. Это связано с биологическими особенностями культуры клеток как биологической системы — в популяции клеток происходит отбор по интенсивности пролиферации, а не по способности к синтезу ценных для человека веществ. Таким образом, получить в постоянно делящихся клетках растений надлежащий уровень синтеза «веществ интереса» — достаточно сложная задача. К настоящему времени в ИФР РАН получены многие штаммы-продуценты ценных БАВ. Среди них штаммы диоскореи дельтовидной — продуценты фуросталовых гликозидов, стефании голой — продуценты стефарина, серпухи и живучки — продуценты экдистероидов. Уникальный штамм клеток диоскореи дельтовидной в суспензионной культуре продуцирует только фуростаноловые гликозиды, что обусловливает его преимущества по сравнению с интактным растением (в растении синтезируются спиростаноловые гликозиды с другими свойствами) [6, 17]. В Медицинском радиологическом научном центре РАМН установлено, что препарат фуростаноловых гликозидов из культуры клеток диоскореи обладает выраженными иммуностимулирующими и повышающими неспецифическую резистентность свойствами, в то время как препараты из интактных растений, в которых в значительном количестве содержатся спиростаноловые гликозиды — выраженными иммунодепрессивными свойствами.

В табл. 2 приведены некоторые растительные БАВ, содержание которых в культуре клеток выше, чем в интактном растении.

В Белорусском государственном университете получены каллюсные и суспензионные культуры таких лекарственных растений, как эхинацея пурпурная (*Echinacea purpurea* (L.) Moench), шалфей лекарственный (*Salvia officinalis* L.), расторопша пятнистая (*Sylibum marianum* L.), сирень обыкновенная (*Syringa vulgaris* L.), каллизия душистая (*Callisia fragrans* (Lindl.) Woods.), пажитник греческий (*Trigonella foenumgraecum* L.), катарантус розовый (*Catharanthus roseus* G. Don), барвинок малый (*Vinka minor* L.) и др. В корнях барвинка малого впервые идентифицированы монотерпеновые серпентин- и аймалицинподобные алкалоиды. В каллюсных культурах *Vinca minor* и *Catharanthus roseus* стриктозидина накапливается существенно больше, чем в интактных растениях [22].

Оптимизация роста штамма и синтеза целевого продукта. Для многих штаммов культур клеток оптимизировано культивирование и разработа-

ТАБЛИЦА 1. Стоимость веществ растительного происхождения и ориентировочный объем их рынка [47, 59, 67]

Продукт/действие	Вид	Дол. США за 1 кг	Объем рынка, кг/год
Аймалицин/антигипертензивное	Катарантус розовый — *Catharanthus roseus* (L.) G. Don	37 000	—
Аймалин/антиаритмическое	Раувольфия змеиная — *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz.	75 000	—
Артимизин/антималярийное	Полынь однолетняя — *Artemisia annua* L.	400	—
Берберин/антимикробное	Коптис японский — *Coptis japonica* (Thunb.) Makino.	3250	—
Винкристин, винбластин/противоопухолевое	Катарантус розовый — *Catharanthus roseus* (L.) G. Don	3 000 000 800 000	(100)
Дигоксин/сердечный гликозид	Наперстянка шерстистая — *Digitalis lanata* L.	3000	4000
Диосгенин/синтез гормонов	Диоскорея дельтовидная — *Dioscorea deltoidea* Wall. ex Kunth	1000	200 000
Камптотецин/противоопухолевое	Камптотека остроконечная — *Camptotheca acuminata* Decne	500 000	1000
Кодеин/седативное	Мак снотворный — *Papaver somniferum* L.	17 000	7700
Колхицин/противоопухолевое	Безвременник великолепный — *Colchicum speciosum* Stev.	35 000	—
Подофиллотоксин/противоопухолевое	Подофилл щитовидный — *Podophyllum peltatum* L.	800 000	—
Сангвинарин/антимикробное	Сангвинария канадская — *Sanguinaria canadensis* L.	4800	—
Таксол/противоопухолевое	Тисс коротколистный — *Taxus brevifolia* Nutt.	2 000 000	(200)
Хинин/антималярийное, тонизирующее	Цинхона Леджера — *Cinchona Ledgeriana* Moens	500	5 000 000
Шиконин/антимикробное	Воробейник краснокорневой — *Lithospermum officinale* var. *erythrorhizon* (Siebold & Zucc.) Maxim	4500	150
Эллиптициин/противоопухолевое	Охрозия эллиптическая — *Ochrosia elliptica* Labill.	240 000	—

на технология выращивания в биореакторах с максимальным объемом до 75 000 л (фирма «Phyton», США/Германия).

Первое в мире промышленное производство биомассы культурных клеток осуществлено в России: еще в конце 1970-х годов на ряде заводов Главмикробиопрома было организовано производство биомассы культуры клеток женьшеня. На основе этой биомассы созданы как медицинские препараты (настойка «Биоженьшень»), так и косметические средства (шампунь «Диона», лосьон «Женьшеневый» и др.). В настоящее время из культуры клеток полисциаса производится пищевая добавка «Витагмал», проявляющий адаптогенные и антистрессовые свойства.

ТАБЛИЦЯ 2. Культуры клеток — сверхпродуценты вторичных метаболитов [59, 65, 70]

Соединение	Вид	Содержание в культуре клеток, % массы сухого вещества	Содержание в интактных растениях, % массы сухого вещества	Отношение содержания культура клеток/ растение
Антоцианы	Виноград — *Vitis* sp.	16	10	1,6
	Эуфорбия блестящая — *Euphorbia milii* Des Moul.	4	0,3	13,3
	Перилла многолетняя — *Perilla frutescens* (L.) Britt.	24	1,5	16
Антрахиноны	Моринда цитрусолистная — *Morinda citrifolia* L.	18	2,2	8
Берберин	Коптис японский — *Coptic japonica* (Thunb.) Makino.	13	4	3,3
	Василистник малый — *Thalictrum minus* L.	10	0,01	1000
Сангвинарин	Мак снотворный — *Papaver somniferum* L.	2,5	—	—
Ятроризин	Барбарис Вильсона — *Berberis wilsonae* Hemsl. et Wils.	10	—	—
Шиконин	Воробейник краснокорневой — *Lithospermum officinale* L.	20	1,5	13
Розмариновая кислота	Шалфей лекарственный — *Salvia officinalis* L.	36	3,0	9
	Колеус Блюме — *Plectranthus scutellarioides* L. R.Br.	27		
Стероидные гликозиды (диосгенин)	Диоскорея дельтовидная — *Dioscorea deltoidea* Wall. ex Kunth	12(4)	8(3)	1,5
Серпентин	Катарантус розовый — *Catharanthus roseus* (L.) G. Don	2,2	—	—
Аймалицин		1,0	0,3	3,3
Аймалин	Раувольфия змеиная — *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz.	2	—	—
Гинзенозиды	Женьшень обыкновенный — *Panax ginseng* C. A. Mey.	27	4,5	6
Никотин	Табак обыкновенный — *Nicotiana tabacum* L.	3,4	2,0	1,7

Особенно он эффективен для пренатальной (дородовой) безопасности и при постинфарктных состояниях.

За рубежом известны несколько примеров получения лекарственных препаратов на основе культур клеток высших растений. Первое производство суспензионной культуры клеток воробейника осуществлено в Японии, где получают нафтохинон шиконин из этой культуры. Получение противоопухолевого препарата таксола на основе культуры клеток тисса, предпринято фирмой «Phyton» (США/Германия).

Культура клеток высших растений может быть использована не только для получения ценных биологически активных вторичных метаболитов (алкалоиды, изопреноиды, фенольные соединения и др.), но и для наработки терапевтических белков, включая моноклональные антитела, человеческий сывороточный альбумин, человеческий гемоглобин, интерферон, иммуностимулирующие аллергенные белки, инактиватор рибосом трихосантин и нейропептид лейэнкефалин. Однако известны лишь немногие случаи успешного применения данного метода (табл. 3). Такая ситуация обусловлена прежде всего следующими причинами: продуктивность культур клеток по целевым продуктам часто недостаточна для организации рентабельного производства [47]; культуры клеток являются сложным биотехнологическим объектом; период выращивания относительно длителен, чувствительность клеток к механическим воздействиям и вариабельность клеток in vitro высоки. Как следствие — значительная стоимость получаемой биомассы и целевого продукта.

ТАБЛИЦА 3. Культуры клеток растений, используемые для промышленного производства биологически активных веществ [38, 48]

Вид	Продукт	Фирма (страна)
Дубоизия — *Duboisia myoporoides* R.Br.	Скополамин	Sumitomo Chemical Industries (Япония)
Подофилл щитовидный — *Podophyllum peltatum* L.	Подофиллотоксин	Nippon Oil (Япония)
Коптис японский — *Coptis japonica* (Thunb.) Makino., василистник малый — *Thalictrum minus* L.	Берберин	Mitsui Petrochemical Industries (Япония)
Тисс коротколистный — *Taxus brevifolia* Nutt.	Паклитаксел	ESCAgentics (США) Phyton Catalytic (США/Германия) Nippon Oil (Япония)
Колеус Блюме — *Plectranthus scutellarioides* (L.) R.Br.	Розмариновая кислота	Nattermann (Германия)
Женьшень обыкновенный — *Panax ginseng* C. A. Mey.	Биомасса клеток	Nitto Denko (Япония) Заводы Биопрома (Россия)
	Адвентивные корни	CBN Biotech (Корея)
Эхинацея пурпурная — *Echinacea purpurea* (L.) Moench, эхинацея узколистная — *E. angustifolia* DC	Иммуностимулирующие полисахариды	Diversa (Германия)
Воробейник краснокорневой — *Lithospermum officinale* L.	Шиконин	Mitsui Petrochemical Industries (Япония)
Катарантус розовый — *Catharanthus roseus* (L.) G. Don	Арбутин	Mitsui Petrochemical Industries (Япония)
Сафлор красильный — *Carthamus tinctorius* L.	Картамин	Kibun (Япония)
Ванильная орхидея — *Vanilla planifolia* Andrew	Ванилин	ESCAgenetics (США)
Свекла обыкновенная — *Beta vulgaris* L.	Бетацианины	Nippon Shinyaku (Япония)
Эуфорбия блестящая — *Euphorbia milii* Des Moul., аралия сердцевидная — *Aralia cordata* Thunb.	Антоцианины	Nippon Paint (Япония)

Заслуживает внимания использование для получения БАВ растительного происхождения культур органов растений. Хотя это направление известно более полувека, интерес к таким объектам как источникам БАВ появился относительно недавно. Примерами могут быть культура in vitro побегов *Artemisia annua* L., которая содержит небольшие количества антималярийного сесквитерпенового лактона артемизинина; культура побегов катарантуса розового, которая после регенерации корней накапливает небольшие количества винбластина.

В числе инноваций в биотехнологии растений следует отметить генетическую трансформацию растений с помощью диких штаммов почвенной бактерии *Agrobacterium rhizogenes* для последующего получения корней, способных к длительному росту на относительно простых питательных средах, не содержащих ростовых веществ [45].

Стремительное развитие указанных выше направлений биотехнологии явилось практическим воплощением успехов в области теоретической биохимии, молекулярной биологии и генетики растений. Дальнейшее развитие биотехнологии неразрывно связано с постоянным научным сопровождением.

1. *Алексеенко Л.В.* Влияние условий культивирования in vitro на дальнейшее поведение ex vitro растений земляники садовой (*Fragaria ananassa* Duch.) / Л.В. Алексеенко, О.Н. Высоцкая, В.А. Высоцкий // Плодоводство и ягодоводство России: [сб. науч. работ] / Всерос. селекц.-технол. ин-т садоводства и питомниководства. — М., 2005. — Т. 12. — С. 337—342.
2. *Батыгина Т.Б.* Движение ядра и клеток в развивающемся пыльцевом зерне / Т.Б. Батыгина, Н.Н. Круглова // Эмбриология цветковых растений: терминология и концепции / Ред. Т.Б. Батыгина. — СПб., 1994. — Т. 1: Генеративные органы цветка. — С. 99—101.
3. *Биохимический* и молекулярно-генетический анализ многоколосника морщинистого (*Agastache Rugosa* (Fisch. et. Mey.) Kuntze) в культуре in vitro / Е.В. Спиридович, Т.И. Фоменко, А.Б. Власова, Т.В. Мазур, А.Н. Юхимук // Вестн. фармации. — 2012. — № 4. — С. 75—87.
4. *Бутенко Р.Г.* Биология клеток высших растений in vitro и биотехнологии на их основе: Учебн. пос. — М.: ФБК-Пресс, 1999. — 160 с.
5. *Бутенко Р.Г.* Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. — М.: Наука, 1964. — 272 с.
6. *Влияние* предшественника синтеза изопреноидов на ростовые и биосинтетические характеристики культуры клеток *Polyscias fruticosa* (L.) Harms / Е.С. Суханова, Д.В. Кочкин, Э.И. Гафиятова, А.М. Носов // Вестн. Сев.-Вост. федер. ун-та им. М.К. Аммосова. — 2011. — № 4. — С. 40—44.
7. *Генетические* и биологические (зоологические и ботанические) коллекции Российской Федерации [Электронный ресурс]. — Режим доступа: http:/www.sevin.ru/collections/cell-colls/rccp.html. — Дата доступа: 10.10.2013.
8. *Голубика* высокорослая (*Vaccinium corymbosum* L.) / В.Н. Решетников, А.В. Кильчевский, Ж.А. Рупасова, В.Л. Филипеня, О.В. Чижик, В.И. Горбацевич, А.А. Иванович // Генетические основы селекции растений / Науч. ред. А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. — Минск, 2012. — Т. 3: Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия. — С. 347—355.
9. *Егорова Н.А.* Биотехнологические основы создания новых форм и размножения эфиромасличных растений: Дис. ... д-ра биол. наук. — Симферополь, 2012. — 452 с.
10. *Ермишин А.П.* Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А.П. Ермишин, В.Е. Подлисских, Е.В. Воронкова, Б.Ю. Аношенко, В.М. Зарьков. — Минск: Тэхналогія, 2005. — 430 с.
11. *Зайцева О.И.* Характеристика пыльцевого эмбриогенеза у сортов и гибридов ярового тритикале / О.И. Зайцева, П.А. Орлов // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. — 2009. — № 1. — С. 63—67.
12. *Картель Н.А.* Биотехнология в растениеводстве: Учебник / Н.А. Картель, А.В. Кильчевский. — Минск: Тэхналогія, 2005. — 309 с.
13. *Клеточная* биотехнология: Учебное пособие / Г.П. Пинаев, М.И. Блинова, Г.Г. Полянская, Н.С. Николаенко, Т.Н. Ефремова, Н.С. Шарлаимова, Н.А. Шубин. — СПб.: Изд-во Санктпетерб. политехн. ун-та, 2012. — 214 с.
14. *Кунах В.А.* Біотехнологія лікарських рослин. — К.: Логос, 2005. — 730 с.

15. *Кухарева Л.В.* Перспективы развития лекарственного и пряно-ароматического растениеводства в Беларуси / Л.В. Кухарева, В.Н. Решетников, И.К. Володько // Тр. Белорус. гос. ун-та. Сер. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. — 2009. — Т. 4, ч. 2. — С. 164—167.
16. *Митрофанова И.В.* Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. — Киев: Аграрна наука, 2011. — 344 с.
17. *Носов А.М.* Использование клеточных технологий для промышленного получения биологически активных веществ растительного происхождения // Биотехнология. — 2010. — № 5. — С. 8—28.
18. *Носов А.М.* Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений / Ред. Р.Г. Бутенко. — М., 1991. — С. 5—20.
19. *От микроспоры* к сорту / Т.Б. Батыгина, Н.Н. Круглова, В.Ю. Горбунова, Г.Е. Титова, О.А. Сельдимирова. — М.: Наука, 2010. — 172 с.
20. *Рахимбаев И.З.* Генетически модифицированные растения: выгоды и риски: Науч.-справ. пособие. — Алматы, 2011. — 174 с.
21. *Решетников В.Н.* Научные и практические аспекты развития биотехнологии растений в Республике Беларусь / В.Н. Решетников, Е.В. Спиридович // Тр. Белорус. гос. ун-та. Сер. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. — 2012. — Т. 7, ч. 1. — С. 69—83.
22. *Содержание* винкамина и идентификация серпентин- и аймалицин-подобных соединений в интродуцированном в Беларуси Барвинке малом / С.Н. Ромашко, Е.М. Червяковский, А.В. Янцевич, О.В. Молчан, В.М. Юрин // Там же. — 2011. — Т. 6, ч. 1. — С. 62—69.
23. *Сохранение* биологического разнообразия растений в культуре ткани in vitro и его рациональное использование / Т.И. Фоменко, В.Н. Решетников, Л.Г. Бердичевец, В.Л. Филипеня, Т.В. Мазур, Н.Г. Брель, О.Н. Козлова, И.Ф. Вайновская, И.М. Чумакова, В.И. Горбацевич // Центральный ботанический сад НАН Беларуси: сохранение, изучение и использование биоразнообразия мировой флоры / Под ред. В.В. Титка, В.Н. Решетникова. — Минск, 2012. — Гл. 14. — С. 265—276.
24. *Спектры* ISSR- и REMAP-маркеров ДНК каллусов яровой пшеницы после этапов криосохранения по методу дегидратации / А.И. Соловьева, Ю.И. Долгих, О.Н. Высоцкая, А.С. Попов // Физиология растений. — 2011. — Т. 58, № 3. — С. 359—366.
25. *Фоменко Т.И.* Особенности морфогенеза и регенерации растений в культуре in vitro люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) / Т.И. Фоменко, М.К. Малюш // Физиология и биохимия культ. растений. — 2010. — Т. 42, № 4. — С. 306—314.
26. *Эмбриологические* основы андроклинии пшеницы: Атлас / Н.Н. Круглова, Т.Б. Батыгина, В.Ю. Горбунова, Г.Е. Титова, О.А. Сельдимирова. — М.: Наука, 2005. — 99 с.
27. *Advancements* in the production of secondary metabolites / N.V. Sree, P. Udayasri, Y.V.V.A. Kumar, B.R. Babu, Y.P. Kumar, V.M. Vijay // J. Natural Products. — 2010. — Vol. 3. — P. 112—123.
28. *Aynalem H.A.* Non-destructive evaluation of in vitro-stored plants: a comparison of visual and image analysis / H.A. Aynalem, T.L. Righetti, B.M. Reed // In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant. — 2006. — Vol. 42, N 6. — P. 562—567.
29. *Benson E.E.* Plant Conservation Biotechnology. — London, University of Abertay, UK: Taylor and Francis Group, 1999. — 309 p.
30. *Bielanski A.* Non-transmission of bacterial and viral microbes to embryos and semen stored in the vapour phase of liquid nitrogen in dry shippers // Cryobiology. — 2005. — Vol. 50, N 2. — P. 206—210.
31. *Bielanski A.* Experimental microbial contamination and disinfection of dry (vapour) shipper dewars designed for short-term storage and transportation of cryopreserved germplasm and other biological specimens // Theriogenology. — 2005. — Vol. 63, N 7. — P. 1946—1957.
32. *Catalogue* of plant cell lines [Electronic resource] / Leibniz Inst. DSMZ. — Mode of access: http:/www.dsmz.de/plant_cell_lines/main.php?menu_id=2. — Date of access: 10.10.2013.
33. *Cole I.B.* Protocols for establishment of an in vitro collection of medicinal plants in the genus Scutellaria / I.B. Cole, F.T. Farooq, S.J. Murch // Methods in Molecular Biology. — 2009. — Vol. 547. — P. 155—165.
34. *Complementary* conservation strategy for coconuts / M.E. Dulloo, R. Rao, F. Engelmann, J.M.M. Engels // Coconuts Genetic Resources / Ed. P. Batugal, R. Rao, J. Oliver. — Malaysia, 2005. — P. 75—90.
35. *Cost* action 871: cryopreservation of Crop Species in Europe [Electronic resource]. — Mode of access: http: // www.agr.kuleuven.ac.be/dtp/tro/cost871/Home.htm. — Date of access: 10.10.2013.

36. *Cryobank* of plant genetic resources in Russian Academy of Sciences / A.S. Popov, E.V. Popova, T.V. Nikishina, O.N. Vysotskaya // Intern. J. Refrigeration. — 2006. — Vol. 29, N 3. — P. 403—410.
37. *Dussert S.* Development of probabilistic tools to assist in the establishment and management of cryopreserved plant germplasm collections / S. Dussert, F. Engelmann, M. Noirot // CryoLetters. — 2003. — Vol. 24, N 3. — P. 149—160.
38. *Eibl R.* Bioreactors for plant cell and tissue cultures / R. Eibl, D. Eibl // Plant Biotechnology and Transgenic Plants / Ed. W.H. Barz, K.M. Oksman-Caldentey. — New York, 2002. — P. 166.
39. *Genetic* and epigenetic stability of cryopreserved and cold-stored hops (*Humulus lupulus* L.) / E.L. Peredo, R. Arroyo-Garcia, B.M. Reed, M.A. Revilla // Cryobiology. — 2008. — Vol. 57, N 3. — P. 234—241.
40. *Harding K.* Genetic integrity of cryopreserved plant cells: a review // CryoLetters. — 2004. — Vol. 25, N 1. — P. 3—22.
41. *Harnischfeger G.* Proposed guidelines for commercial collection of medicinal plant material // J. of Herbs, Spices and Medicinal Plants. — 2000. — Vol. 7, N 1. — P. 43—50.
42. *Hussain Z.* In vitro corm induction and genetic stability of regenerated plants in taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) / Z. Hussain, R.K. Tyagi // Ind. J. of Biotechnology. — 2006. — Vol. 5, N 4. — P. 535—542.
43. *Junqueira A.* Biochemical changes in corn plants infected by the maize bushy stunt phytoplasma / A. Junqueira, I. Bedendo, S. Pascholati // Physiol. and Mol. Plant Pathol. — 2004. — Vol. 65, N 4. — P. 181—185.
44. *Karuppusamy S.* A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures // J. of Medicinal Plants Res. — 2009. — Vol. 3, N 13. — P. 1222—1239.
45. *Kuzovkina I.N.* Genetically transformed root cultures — generation, properties and application in plant sciences // I.N. Kuzovkina, B. Schneider / Progress in Botany: Genetics, Physiology, Systematics, Ecology // Ed. K. Esser [et al.]. — Heidelberg, 2006. — Vol. 67. — P. 275—314.
46. *Lange D.* Trade in plant material for medicinal and other purposes: a German case study // TRAFFIC Bull. 1997. — Vol. 17, N 1. — P. 20—32.
47. *Large* scale culture of ginseng adventitious roots for production of ginsenosides / K.Y. Paek, H.N. Murthy, E.J. Hahn, J.J. Zhong // Advances in Biochem. Engineering / Biotechnology. — 2009. — Vol. 113. — P. 151—176.
48. *McCoy E.* Natural products from plant cell cultures / E. McCoy, S.E. O'Connor // Progress in Drug Research. — 2008. — Vol. 65. — P. 330—370.
49. *Medicinal* plants for forest conservation and health care / Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). — Rome, Italy, 1997. — 158 p. (Non-Wood Forest Products Series; N 11).
50. *Micropropagation* and in vitro conservation of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) in the Republic of Papau [Electronic resource]. — Mode of access: http: // search.engrant.com/project/DJc58s/micropropagation_and_in_vitro_cons_ervation_of_taro_(colocasia_esculenta_(l_)_schott)_in_the. — Date of access: 10.10.2013.
51. *Misra A.* Studies on biochemical and physiological aspects in relation to phytomedicinal qualities and efficacy of the active ingredients during the handling, cultivation and harvesting of the medicinal plants / A. Misra // J. of Medicinal Plants Res. — 2009. — Vol. 3, N 13. — P. 1140—1146.
52. *Morris J.* A simple assay system to monitor the potential for contamination during different stages of cryopreservation // Cryobiology. — 2008. — Vol. 57, N 3. — P. 328.
53. *Moukadiri O.* Physiological and genomic variations in rice cells recovered from direct immersion and storage in liquid nitrogen / O. Moukadiri, C.R. Lopes, M.J. Cornejo // Physiol. Plant. — 1999. — Vol. 105, N 3. — P. 442—449.
54. NCGR-Corvallis — *Fragaria* Germplasm [Electronic resource]. — Mode of access: http: // www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=11324. — Date of access: 10.10.2013.
55. *Panis B.* Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees) / B. Panis, M. Lambardi // The Role of Biotechnology for the Characterization and Conservation of Crop, Forestry, Animal and Fishery Genetic Resources: intern. workshop, Turin, Italy, 5—7 March 2005 / Food and Agriculture Organization of the United Nations. — Rome, 2005. — P. 1—12.
56. *Phytoplasma* infection may affect morphology, regeneration and pyrethrin content in pyrethrum shoot culture / J. Ambrozic-Dolinsek, M. Camloh, J. Zel, M. Kovac, M. Ravnikar, L. Carraro, N. Petrovic // Sci. Hort. — 2008. — Vol. 116, N 2. — P. 213—218.
57. *Postman J.* Detection and elimination of viruses in USDA hop (*Humulus lupulus*) germplasm collection / J. Postman, J. DeNoma, B.M. Reed // Acta Hort. — 2005. — Vol. 668. — P. 143—147.
58. *Probability* of lethal damages of cryopreserved biological objects during storage / I.P. Vysekantsev, T.M. Gurina, V.F. Martsenyuk, T.F. Petrenko, E.V. Kudokotseva, S.V. Koshchiy, M.I. Groshevoy // CryoLetters. — 2005. — Vol. 26, N 6. — P. 401—408.