



**Игнатова Светлана Александровна,** доктор биологических наук, биолог, биотехнолог, заведующая лабораторией культуры тканей Южного биотехнологического центра в растениеводстве Национальной академии аграрных наук Украины. Автор и соавтор более 200 работ в области биотехнологии сельскохозяйственных растений, в том числе научных статей, авторских свидетельств об изобретениях, декларационных патентов «на полезную модель», методических рекомендаций. Руководит подготовкой аспирантов по специальности «биотехнология». Является членом специализированных научных советов по защите диссертаций по специальности «биотехнология» и членом-экспертом координационно-методического совета государственной научно-технической программы «Сельскохозяйственная биотехнология».

**КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ,  
ГЕНЕТИКЕ И СЕЛЕКЦИИ ВОЗДЕЛЫВАЕМЫХ РАСТЕНИЙ**

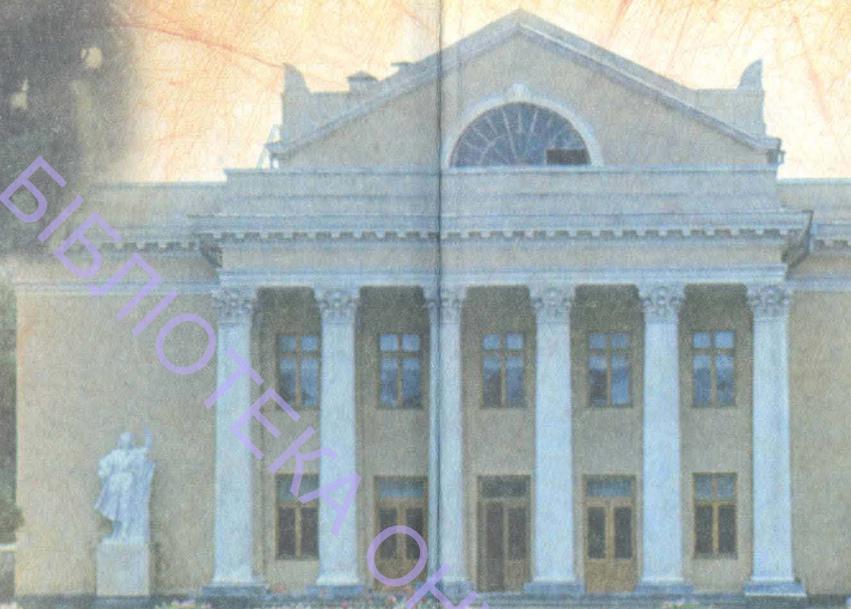
С. А. Игнатова

С. А. Игнатова



## **КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ, ГЕНЕТИКЕ И СЕЛЕКЦИИ ВОЗДЕЛЫВАЕМЫХ РАСТЕНИЙ:**

ЗАДАЧИ, ВОЗМОЖНОСТИ,  
РАЗРАБОТКИ СИСТЕМ *in vitro*



НАУКОВА БІБЛІОТЕКА ОНУ ІМЕНІ І МЕУНІКОВА

Допомог  
Сабине Висаавіч  
в знак особого  
уваження  
7.10.2011

НАУКОВА БІБЛІОТЕКА ОНУ імені І. І. МЕЧНИКОВА

С. А. Игнатова

**КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ  
В РАСТЕННЕВОДСТВЕ,  
ГЕНЕТИКЕ И СЕЛЕКЦИИ  
ВОЗДЕЛЫВАЕМЫХ РАСТЕНИЙ:**

ЗАДАЧИ, ВОЗМОЖНОСТИ,  
РАЗРАБОТКИ СИСТЕМ *in vitro*

Одесса  
«Астропринт»  
2011

УДК 581.17:631.147  
ББК 28.57  
И26

Рецензенты:

**О. В. Митрофанова**, доктор биологических наук, профессор, заслуженный деятель науки и техники Украины, главный научный сотрудник лаборатории биохимии, биотехнологии и вирусологии растений НБС–ННЦ;

**В. И. Сичкарь**, доктор биологических наук, профессор, зав. отделом селекции, генетики и семеноводства зернобобовых культур СГИ НЦНС УААН

Рекомендовано к печати ученым советом Южного биотехнологического центра в растениеводстве НААН Украины. (Протокол № 7 от 04.07.2011 г.)

**Игнатова С. А.**

И26 Клеточные технологии в растениеводстве, генетике и селекции возделываемых растений: задачи, возможности, разработки систем *in vitro*: [монография] / С. А. Игнатова. — Одесса: Астропринт, 2011. — 224 с.

ISBN 978–966–190–444–5

В монографии изложены результаты научно-исследовательской работы автора по совершенствованию биотехнологических систем *in vitro*, направленной на получение исходного материала и ускорение селекции пшеницы, ячменя, тритикале. В работе рассматривается круг вопросов, связанных с реализацией клетками эксплантов тотипотентности в культуре *in vitro*. Актуальность проведенных исследований заключается в изучении комплекса факторов различной природы, влияющих на процессы дифференциации, пролиферации, пути морфогенеза и регенерации растений. Результаты исследований являются основой разработанных биотехнологий повышения эффективности селекционного процесса важнейших сельскохозяйственных культур.

Монография предназначена для специалистов в области биотехнологии в растениеводстве, может быть учебным пособием для преподавателей, аспирантов и студентов биологических и сельскохозяйственных высших учебных заведений.

УДК 581.17:631.147  
ББК 28.57

ISBN 978–966–190–444–5

© Игнатова С. А., 2011

## Содержание

Перечень условных сокращений .....	6
Введение .....	7
А). История развития биотехнологии растений на основе систем <i>in vitro</i> .....	8
Б). Проблемы растениеводства и использование методов культуры <i>in vitro</i> для их решения .....	10
В). Растительная клетка, её анатомические, физиологические особенности и функциональная активность .....	15
<b>Раздел 1</b>	
Биотехнологии получения линейного материала хлебных злаков на основе гаплоидов, их возможности, проблемы, интенсификация процесса гаплопродукции у возделываемых злаков в работах, приведенных исследователями разных стран ....	35
1.1. Метод культивирования пыльников <i>in vitro</i> — гаплопродукционная система для получения гомозиготного материала экономически важных видов злаков: факторы, влияющие на её результативность, использование результатов, полученных разными авторами в генетике и селекции этих культур .....	36
1.1.1. Недостатки и проблемы, проявляющиеся при прохождении гаплопродукционного процесса в культуре пыльников злаков, — факторы снижения эффективности метода; причины их появления и возможности преодоления .....	63
1.2. Изучение гаплопродукционного процесса в культуре пыльников <i>in vitro</i> тритикале, пшеницы и гибридов с их участием — с целью разработки биотехнологии получения гомозиготных линий из этого материала в условиях юга Украины	
1.2.1. Влияние различных факторов на этапы гаплопродукционного процесса у разных генотипов пшеницы и тритикале .....	69

## Раздел 2

Метод эмбриокультуры — базис биотехнологий создания гаплоидов и различных типов гибридов при отдалённой гибридизации злаков

- 2.1. Метод гаплопродюсеров в создании гаплоидов у злаков: его основа, развитие исследований в разных странах по изучению факторов результативности метода при применении его в селекционно-генетической работе с ячменём и пшеницей ..... 96
  - 2.1.1. Разработка параметров биотехнологической системы получения гаплоидов и удвоенных гаплоидов ячменя на основе скрещиваний его генотипов с гаплопродюсерами — *H. bulbosum* и *S. cereale* для использования результатов работы в целях селекции ячменя в Украине ..... 101
    - 2.1.1.1. Получение отдалённых гибридов ячменя с устойчивостью к абиотическим и биотическим факторам окружающей среды в климатических условиях Одесского региона ..... 108
- 2.2. Создание биотехнологий получения растений отдалённых гибридов на основе пшеницы с использованием метода эмбриокультуры ..... 109

## Раздел 3

Клеточные популяции растений в условиях *in vitro* — источник генетической изменчивости, разработка на этой основе биотехнологий создания нового исходного материала для селекции различных возделываемых видов ..... 115

- 3.1. Разработка системы *in vitro* для селекции форм ярового ячменя, отличающихся повышенным уровнем устойчивости к хлориду натрия ..... 131
- 3.2. Разработка принципов селекции *in vitro* люцерны на фузариозоустойчивость на основе культивирования её соматических эксплантов в селективных условиях .... 135
- 3.3. Методические основы для разработки систем отбора форм мягкой пшеницы и ячменя с устойчивостью к грибным патогенам в условиях *in vitro* ..... 141

## Раздел 4

Совершенствование результативных систем вегетативного размножения растений в условиях *in vitro* — определяющий принцип разработки технологий клонального микроразмножения полезных, уникальных форм растений с целью их сохранения, оздоровления и интродукции, представленное в работах разных исследователей ..... 145

## Раздел 5

Результаты разработок перспективных генно-инженерных технологий на основе методов *in vitro* для создания новых типов растений культивируемых видов с целью использования их в разных направлениях селекции ..... 151

Заключение ..... 159

Список использованной литературы ..... 160

Терминологический словарь ..... 219

## Перечень условных сокращений

2,4-Д	2,4-Дихлорфеноксисукусная кислота
2ИП	N6- (2 Изопентенил) аденин
6-БАП	6-Бензиламинопурин
BLS	питательная среда Blaydes [159]
C17	питательная среда [191]
LS	питательная среда [508] Linsmaer-Skoog
MS	питательная среда [162] Murashige & Skoog
N 6	питательная среда [158]
P-2	питательная среда [181]
QTL	локусы количественных признаков
RAPD	анализ амплифицированных продуктов полимеразной цепной реакции
SH	питательная среда [625] Shenk & Hildebrandt
Yu PEI	питательная среда [179]
АБК	абсцизовая кислота
ГБ-5	питательная среда [163] Gamborg B-5
ГК	гибберелловая кислота
ИМК	3 Индолмасляная кислота
ИУК	Индолил-3-уксусная кислота
КИН	кинетин
НУК	1- Нафтилуксусная кислота
ПАБ	парааминобензойная кислота
P-1	питательная среда [161]
ХФУ	хлорфеноксисукусная кислота
UPOV	Международная организация защиты новых сортов растений

Светлой памяти С. Ф. Лукьянюк  
посвящается

## Введение

Результаты исследований по генетике, физиологии и молекулярной биологии, проведенные за последние 30 лет на уровне отдельных клеток растений и их популяций, явились основой для разработок приёмов и методов биотехнологии растений для целей растениеводства. В свете современных представлений биотехнология растений — это объединение методов и принципов генетической и клеточной инженерии растений с целью создания на этой основе новых эффективных систем совершенствования растительного организма экономически ценных видов в конкретных направлениях селекции или для ускоренного создания нового исходного селекционного материала. Для успешной работы в этих аспектах на клеточном, тканевом и организменном уровне растения имеют преимущество перед животными благодаря присущему их клеткам феномену тотипотентности — способности полностью реализовать свой потенциал развития — омнипотентность ядра (т. е. все потенции и генетическую информацию ядра зиготы). Это делает возможным осуществление генетической программы развития целого организма растения из его единичной, отобранной в условиях *in vitro* клетки и получение растения с новыми искомыми свойствами, необходимыми конкретному виду [1]. Реализации этого феномена с помощью методов *in vitro* в настоящее время уже можно достигать с высокой воспроизводимостью [2].

Таким образом, в системах *in vitro*, функционирующих на основе разных типов морфогенеза — органогенеза, гистогенеза и клеточной дифференцировки, реализующихся в процессах регенерации растений из популяции клеток и на базе развития апикальных и интеркалярных меристемных зон, можно эффективно решать экспериментальные задачи по получению разнообразных растительных продуктов и новых форм растений.

#### А). ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ НА ОСНОВЕ СИСТЕМ *IN VITRO*

Началом развития метода культивирования изолированных тканей и клеток растений в условиях *in vitro* считают работы по выращиванию эксплантов тканей высших растений в изолированной культуре, проведенные на рубеже XIX–XX столетий немецкими исследователями Фьохтингом, Броуном, Рехингером и Морисом. Развитие исследований в этом аспекте, уже как нового направления биологической науки, относят к первой половине XX века, когда в 30-х годах в мировой печати появились первые результаты, полученные исследователями разных стран — Габерландтом (Германия), Уайтом (США), Готре и Морелем (Франция). В 1959 году в монографии французского исследователя Готре были обобщены результаты проведенной к этому времени в условиях *in vitro* работы на 142 видах растений в лабораториях разных стран. Считают, что именно тогда была сформулирована идея разработки методов культуры тканей и клеток *in vitro* как одной из перспективных экспериментальных биологических систем для работы с растительными организмами в аспекте их генетического улучшения. Что, по мнению исследователей, и явилось началом интенсивного проведения работ в области *in vitro* культивирования эксплантов из разных растительных объектов [2, 7].

Результаты исследований по культивированию тканевых культур разных видов, проведенных в странах Европы и бывшем Советском Союзе в 50–70-х годах XX столетия, и дальнейшее совершенствование техники культивирования клеток и тканей растений *in vitro* на основе знаний в области клеточной биологии позволили уже в 80-е годы приступить к осуществлению целевых биотехнологических программ по ускорению и увеличению результативности селекционно-генетического процесса на базе различных *in vitro* систем [7, 8]. В этих работах культивируемые растительные экспланты рассматривались как микрообъекты. Применяя к ним логику, используемую в микробиологии, исследователи в условиях *in vitro* достигали реализации тотипотентности их клеток и осуществляли развитие, рост и размножение. Полученные результаты на основе культивирования *in vitro* клеток, тканей и органов растений позволили создать новые технологии для решения разных практических задач растениеводства. Перспективными направлениями считались три: 1 — получение промышленным способом ценных биологически активных веществ рас-

тительного происхождения [2], 2 — клональное микроразмножение и оздоровление растений на основе тканевых и клеточных культур и получение линейного материала на основе гаплоидов, 3 — использование методов клеточной инженерии для генетического изменения клеток и получения на этой основе растений нового типа.

В последующем периоде времени, в результате практической реализации проектов первого из вышеуказанных направлений, на основе выделения клеток-продуцентов различных ценных соединений для медицины и других отраслей в СССР были созданы биотехнологии синтеза вторичных веществ — алкалоидов, гликозидов и стероидов. С их помощью удалось практически решить задачи по получению продуктивных штаммов клеточных культур с высокой биосинтетической активностью.

Использование мутагенеза, затем и селекции на клеточном уровне растений, позволило исследователям разных институтов Академии наук СССР осуществить получение наиболее продуктивных клеточных линий раувольфии змеиной, диоскореи дельтовидной и продуктивных штаммов клеток руты душистой. Интересные в научном плане работы были проведены при использовании ферментного аппарата клеток для биотрансформации разных химических соединений. Прогресс в этой области исследований открыл перспективу использования растительных клеток, иммобилизованных на гелях, способных к трансформации одних химических соединений в другие — более активные, подходящие для использования в медицине.

Применение культуры тканей и клеток для оздоровления и эффективного клонального размножения растений реализовалось в технологиях семеноводства картофеля на безвирусной основе и оздоровления посадочного материала садовой земляники, малины, декоративных растений от вирусов. Ценность этих технологий состояла в быстром получении высококачественного посадочного материала, что представлялось особенно перспективным для разработки технологий размножения ценных древесных пород. К тому времени широкое развитие этого биотехнологического аспекта было достигнуто и показано в разных научных центрах мира уже более чем на 400 видах растений.

В 70–80-е годы XX столетия интерес к методам культуры клеток, тканей и органов *in vitro* как основе будущих биотехнологий значительно возрос в разных странах мира благодаря широкому использованию их в фундаментальных исследованиях по генетике, физиологии, молекулярной биологии, цитологии и эмбриологии растений. В опреде-

лённом объёме такие исследования начали проводиться и в научных учреждениях республик бывшего Советского Союза. В 80-х годах стремительно начали развиваться исследования по разработке методов *in vitro* культивирования разных эксплантов растений, направленных на ускорение селекционного процесса у экономически ценных видов в разных странах. В крупных селекционных центрах мира развитие получают исследования по разработке приёмов и методов *in vitro* для создания гомозиготных линий из гаплоидов и для расширения генетического разнообразия возделываемых растительных культур по хозяйственно-ценным признакам с помощью отдалённой гибридизации.

Получают развитие также разработки разных направлений селекции *in vitro* для отбора на уровне органов, тканей и клеток генотипов с искомыми уровнями разных признаков возделываемых видов растений. Наряду с указанными направлениями исследований, в это же десятилетие расширяются и проводимые в условиях *in vitro* работы, ориентированные на создание эффективных методов размножения и оздоровления ценного селекционного материала разных видов — овощных, декоративных и древесных культур.

Осмысливание первых результатов, полученных в 90-х годах XX века на основе систем *in vitro* на клетках, тканях и органах растений привело исследователей к выводу о состоявшемся утверждении нового направления экспериментальной биологии — клеточной биотехнологии растений. Дальнейшее совершенствование методологии разных систем *in vitro* на основе генетической и селекционной оценки, полученного растительного материала в результате их функционирования, позволило исследователям в разных странах приступить к разработке на этой основе новых эффективных биотехнологий, направленных на улучшение важнейших сельскохозяйственных культур. Что вскоре уже было представлено конкретными государственными программами по селекционно-генетическому улучшению на этой основе разных экономически ценных возделываемых видов [7].

#### **Б). ПРОБЛЕМЫ РАСТЕНИЕВОДСТВА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ КУЛЬТУРЫ IN VITRO ДЛЯ ИХ РЕШЕНИЯ**

Исходя из существующих, разных по своей направленности и значению, проблем растениеводческой практики важным и необходимым является проведение разработок эффективных биотехноло-

гических методов клонального микроразмножения экономически ценных культур растений по нескольким причинам. Первая — с целью сохранения редких исчезающих видов, вторая — с целью оздоровления растений от вирусной инфекции посредством культуры меристем (поскольку известно, что меристемные ткани, как правило, не заражены вирусами), третья — с целью ускоренного производства ценного и здорового посадочного материала растений для селекционных питомников. Биотехнологии на основе *in vitro* методов в этих направлениях в настоящее время признаны рентабельными при использовании их для размножения разных видов овощных, садовых, цветочных и лекарственных культур, а также в аспекте широкомасштабного размножения экономически важных и ценных пород деревьев и кустарников.

В целях ускоренного создания линейных продуктивных сортов с ценными адаптивными свойствами (по требованию международной комиссии UPOV) для селекции самоопыляющихся злаковых культур большой практический интерес представляет получение нового перспективного гомозиготного растительного материала из гибридных популяций, находящихся на ранних этапах селекционного процесса. Для этой цели необходимый материал посредством гаплоидии на основе использования приёмов и методов *in vitro* можно создавать всего за 2–3 года, вместо 10–15 лет, как это имеет место в традиционной селекции. С помощью гаплоидов повышается эффективность отбора форм с признаками, определяющимися рецессивными генами, а отсутствие доминантности у гаплоидных форм позволяет ускорить выбор необходимого генотипа по фенотипу. Проведение разработок в аспекте повышения эффективности и результативности систем *in vitro*, используемых для получения гаплоидов мягкой пшеницы и ячменя с помощью метода культуры пыльников и метода гаплопродюсеров, является в настоящее время перспективным и востребованным селекционерами направлением биотехнологии в разных странах. Доказательством этому являются достигнутые в мире успехи в ускоренном создании этими методами новых сортов [31].

Для расширения генетического разнообразия селекционного материала важнейших злаковых культур по разным признакам и свойствам, и особенно — по устойчивости к биотическим и абиотическим факторам окружающей среды и улучшению технологически важных характеристик зерна, эффективно привлечение метода отдалённой гибридизации культурных форм злаков с их близкими и дальними

генетическими сородичами. Вследствие генетических различий родительских генотипов, участвующих в гибридизации, в отличающихся от благоприятных для их произрастания климатических условиях является необходимым проведение разработок по преодолению про- и постгамной несовместимости родительских форм, как правило, проявляющихся в таком типе скрещиваний. Кроме этого возникает необходимость и в сохранении жизнеспособности образованных в таких комбинациях скрещиваний гибридных зародышей. А это возможно лишь при повышении эффективности используемых для этой цели биотехнологических систем *in vitro* на основе методов оплодотворения и эмбриокультуры.

Дополнительным путём расширения генетического разнообразия возделываемых культур растений является использование приёмов селекции *in vitro* на уровне различных культивируемых эксплантов. Создание биотехнологий этого плана определяется необходимостью разработок стабильных селективных условий для проведения отбора из клеточных популяций в условиях *in vitro* искомым клеточным штаммов — начиная с клеточной (суспензионной) культуры разных сроков культивирования и до образования растительных тканей и органов. И далее при сохранении давления селективных факторов отбора на культивируемый объект — осуществить получение растений-регенерантов. Такая работа представляет интерес для селекции разных культур в аспекте выделения из их эксплантов мутантных клеточных клонов с желаемыми биохимическими свойствами — например, сверхпродуцентов разных биологически активных веществ или необходимых соединений вторичного синтеза. Также она представляет интерес и для выявления популяций клеток, обладающих устойчивостью к разным неблагоприятным факторам окружающей среды.

Всё вышесказанное указывает на реальные перспективы создания на этой основе новых нетрадиционных биотехнологий улучшения растений и открывает возможности для их использования при решении различных вопросов биологической и сельскохозяйственной науки. Например — это широкомасштабное размножение картофеля на базе клонирования меристемных зон лучших селекционных образцов и получение на этой основе безвирусного материала, или использование данного метода в клоневой селекции ягодных, плодовых древесных и цветочно-декоративных культур растений.

Интерес представляют и разработки систем *in vitro* на основе клеточных культур, направленные на получение разных классов вторич-

ных веществ, с целью использования их в фармацевтической, парфюмерной и пищевой промышленности.

Предметом перспективных биотехнологических исследований в разных странах мира становится получение отдалённых гибридов хозяйственно-ценных возделываемых культур в разных родах и семействах высших растений. Это направление получает своё дальнейшее развитие в научных разработках по увеличению эффективности метода отдалённой гибридизации посредством эмбриокультуры и при введении фрагментов рекомбинантных ДНК в протопласты или в продукты их слияния с целью достижения трансформации желаемых признаков и поиска подходов к широкому их использованию в генетике и селекции ценных видов.

Практический интерес представляют работы по индукции в условиях *in vitro* соматональных вариантов у культурных видов для последующего выявления из них генетически изменённых и практически ценных форм с устойчивостью к абиотическим и биотическим факторам окружающей среды с целью дальнейшего использования их в качестве исходного материала в разных направлениях селекции. В настоящее время уже имеются примеры выполнения такой работы — выделенные мутантные формы, устойчивые к гербицидам, аминокислотным аналогам, различным ингибиторам клеточного метаболизма, токсинам патогенов, отдельным ионам, температуре, кислотности среды, осмотикам и солям. Однако возникающие в процессе селекции *in vitro* методические трудности по осуществлению регенерации растений из выделенных клеточных линий разных видов ценных культурных растений ещё во многом не позволяют в необходимом объёме проводить целевую работу с материалом, обладающим важными хозяйственно-ценными признаками и свойствами.

Из всех биотехнологических методов, разрабатываемых в настоящее время, наиболее широкое научно-практическое использование принадлежит гаплоидии [17]. Во-первых, это связано с возможностью использования гаплоидов в генетике и селекции важных с/х культур для создания в короткий срок гомозиготных линий, представляющих селекционеру большие преимущества перед необходимостью повторных циклов инбредных скрещиваний у самоопылителей. Во-вторых — с возможностью сокращения длительного периода достижения стабильной гомозиготности у перекрёстноопыляющихся видов. Подтверждением этому могут служить продемонстрирован-

ные в разных странах мира успехи [31] по созданию в короткий срок из гаплоидов более чем 100 сортов риса и 20 сортов пшеницы в Китае, 40 сортов риса в Корее и на Филиппинах, одного сорта кукурузы в Америке, сорта пшеницы Florin во Франции, одного сорта пшеницы в Австралии, сорта пшеницы Mc Kenzie в Канаде, 20 сортов ячменя в Канаде, более 30 сортов ячменя в других странах мира, нескольких сортов пшеницы в России и трёх сортов ячменя в Украине, нескольких сортов риса и пшеницы в Венгрии, одного линейного сорта риса — в Болгарии. Кроме этого, гаплоиды являются также основой множества созданных сортов картофеля и других важных овощных культур, полученных за годы развития этого биотехнологического направления в разных странах мира.

Для интенсификации развития указанных биотехнологических направлений, в целях широкого практического их использования, в каждом из них необходимо дальнейшее проведение целенаправленной работы по изучению разных вопросов, касающихся разработки эффективных систем *in vitro* для ускоренного получения регенерантов ценных культур, понимания природы регенерации и установления генетической базы этапов морфогенеза. Поскольку все эти вопросы ещё во многом остаются проблемными для многих культурных видов растений.

В этой связи важно продолжать выявление лимитирующих факторов в процессе морфогенеза и проводить поиски снижения их влияния на его отдельные этапы с целью интенсификации результативности существующих биотехнологий. А также не менее важно, наряду с проведением разработок в направлении интенсивного совершенствования существующих биотехнологических методов, продолжать поиск новых эффективных приёмов и способов работы с клеточным материалом для расширения возможности применения их в работах по улучшению геномов культурных и полезных растений.

В теоретическом аспекте такие исследования могут быть направлены на поиски эффективных путей увеличения реализации морфогенетических потенций эксплантов, являющихся основой используемых биотехнологических приёмов. А также — на определение роли генотипического и физиологического факторов и их взаимодействия в процессах морфогенеза в условиях культуры *in vitro* у отдельных видов. Что важно и для совершенствования существующих методов, и создания на их основе эффективных биотехнологий получения нового перспективного исходного материала.

В практическом аспекте все проводимые в этом направлении в разных странах исследования были чётко ориентированы на увеличение эффективности разрабатываемых гаплоидных технологий для сокращения сроков создания линейного исходного материала и в итоге получения из них сортов основных возделываемых культур. И весьма важно то, что получение нового гомозиготного материала у злаков — пшеницы, тритикале, ячменя, риса и разных поколений их гибридов — осуществлялось в рамках комплексного сотрудничества биотехнологов с селекционными подразделениями разных исследовательских учреждений.

Прежде чем приступить к рассмотрению полученных нами и другими исследователями теоретических и практических результатов в вышеуказанных направлениях биотехнологии, необходимо уделить внимание главному её объекту — растительной клетке и её популяциям, которыми оперирует в своей работе исследователь-биотехнолог. Поскольку их материал является основой любого экспланта, используемого в клеточных технологиях, а значит, понимание сути протекающих в них процессов важно для достижения высокого уровня эффективности работы с клеточными культурами.

#### **В). РАСТИТЕЛЬНАЯ КЛЕТКА, ЕЁ АНАТОМИЧЕСКИЕ, ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ**

Растение, как всякий живой организм, состоит из клеток. Клетка — его простейшая и основная единица, она является структурно-функциональной единицей всех живых организмов, элементом их строения и жизнедеятельности. Электронная микроскопия, рентгеноструктурный анализ, ультрацентрифугирование и другие методы исследований за последние 60 лет позволили учёным в лабораториях разных стран мира глубже изучить строение клетки растений, её химический состав, функции её тканей, органов и органелл [9, 19; материалы сайтов: [www.botany.pp.ru](http://www.botany.pp.ru), [fizrast.ru](http://fizrast.ru)].

В природе существуют одноклеточные растения. Это — водоросли (сине-зелёные), грибы и бактерии — так называемые прокариоты, которые на земном шаре распространены повсеместно. Они небольших размеров, отличаются быстрым ростом и коротким временем получения генерации, разнообразием биохимических свойств и генетической гибкостью, лишены ядерной мембраны и не содержат

таких органелл, как высшие растения. Их генетическая информация заключена в единственной кольцевой хромосоме, состоящей из двуцепочечной ДНК, не содержащей основных белков (гистонов), а их ядро лишено митотического аппарата и ядрышек.

Большинство растений на Земле — эукариоты — многоклеточные организмы. Их клетки выполняют все или почти все функции, присущие прокариотическим видам. У них развита способность к тесному сосуществованию с другими клетками в качестве субъединиц многоклеточных организмов. Каждый из органов у этой группы растений выполняет в организме определённую функцию. У цветковых растений органами являются корень, стебель, лист, цветок. Каждый орган построен из нескольких типов тканей, и клетки каждой ткани специализированы по выполняемой ею функции. Исполняя её, они вносят вклад в жизнь целого растения, которая у разных видов представляет собой сочетание и взаимодействие разных клеток, органов и тканей. Таким образом, два типа клеточной организации — прокариотический и эукариотический различаются между собой существенно и во многих отношениях.

Основными компонентами эукариотической клетки являются: ядро, цитоплазма с многочисленными органоидами, отличающимися своим строением и функциями, оболочка и вакуоль. Строение разных тканей и свойства клеток, в связи с их специализацией, различны. Главнейшими группами тканей, из которых построены вегетативные органы высшего растения, не связанные с процессом размножения, являются: покровные, основные, механические, проводящие, выделительные и меристематические. Ткани в органах не изолированы друг от друга, а представлены целыми системами (рис. в.1) с чередованием отдельных элементов. Строение клеток каждой ткани приспособлено к выполнению свойственных им функций.

Покровные ткани (эпидермис, пробка, корка) защищают органы растения от неблагоприятных воздействий окружающей среды: эпидермальные клетки выделяют вещества — кутин и воск, откладывающиеся снаружи в виде плёнки. Внешнее покрытие обеспечивает изоляционные и защитные свойства эпидермальных клеток. Обмен газами с атмосферой и внутренними тканями органов осуществляется с помощью устьиц. При фотосинтезе устьичные щели открыты. Замыкающие клетки закрывают просветы устьиц ночью и в жаркое время от потери воды. Часто эпидермальные клетки образуют выросты — волоски, играющие защитную, опорную и выделительную роль.

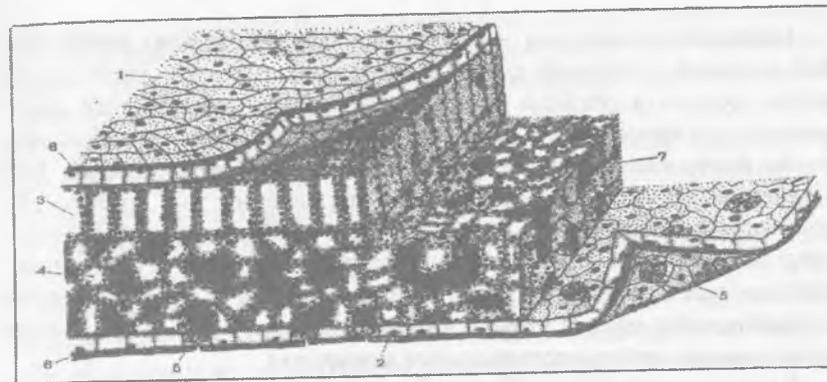


Рис. в.1. Строение листа растения (верхняя и нижняя поверхность, продольный и поперечный срезы). 1 — клетки верхнего эпидермиса; 2 — клетки нижнего эпидермиса; 3 — клетки столбчатой паренхимы; 4 — клетки губчатой паренхимы; 5 — замыкающие клетки устьиц, щель между их парой — просвет устьица; 6 — кутикула, покрывающая эпидермис; 7 — межклеточные пространства, в данном случае губчатой паренхимы, заполнены воздухом. Ядра видны не везде, т. к. срез проходит в стороне от ядра, цитоплазма во всех клетках расположена пристеночно

В стебле под покровными тканями находятся клетки луба. Важнейший его элемент — ситовидные трубки. Оболочки в местах их стыка имеют отверстия, их перегородки подобны ситам. В результате клетки сообщаются между собой и объединяются в длинные трубки, тянущиеся по стеблю и корню. По ним образующиеся вещества (крахмал, масла, смолы и т. д.) перемещаются к разным частям клетки, питая их. Древесина состоит из элементов проводящей, опорной и основной ткани. К первым относятся волокна — длинные клетки с одревесневшими стенками; ко вторым — сосуды, являющиеся результатом слияния многих клеток; к третьим — клетки древесной паренхимы. Проводящая система тянется в лист, сквозь корень и стебель, осуществляя восходящий ток воды и растворенных в ней солей к органам растения. Большинство специализированных клеток неспособно к размножению.

Растение растёт всю свою жизнь и в нём за этот период постоянно образуются новые клетки. Они развиваются из *образовательных клеток* — *меристематических\**. Размножение делением является их специализацией и главной функцией в организме.

\* В тексте выделены положения, представляющие интерес для биотехнологии.

**Апикальная меристема** — верхушечная образовательная ткань стеблей и корней, в которой клетки интенсивно делятся и дают начало новым тканям и органам растений. Возможно использование этого процесса для проведения в культуре *in vitro* клонального микроразмножения растительного материала на основе стеблевых апексов. Что в качестве приёма размножения и оздоровления уже широко используется в цветоводстве, садоводстве, в питомниках размножения плодово-ягодных культур и ценных пород деревьев и кустарников. Размножение пазушными и адвентивными почками из верхушек побегов и меристемных тканей узлов — самый надёжный путь для получения чистого клона любого растительного материала.

В центральной зоне стеблевого апекса расположены клетки со сниженной интенсивностью деления, чем у их окружающих, — это меристема ожидания. Такие же клетки присутствуют и в корневой меристеме. Эти клетки в стебле и в корне могут играть функциональную роль стволовых клеток, из которых при необходимости образуются все остальные меристематические и дифференцированные клетки. Используя экзогенные фитогормональные факторы, в условиях *in vitro* можно вызвать у них морфогенетические реакции и в результате достичь образования различных гистологических структур. Сочетания этих факторов и их концентрации, совместно со световыми и температурными воздействиями, определяют уровень клеточной дифференциации — тип, характер и судьбу возникших структур и дальнейшее их развитие по путям органогенеза или эмбриогенеза. Латеральная меристема — образовательная ткань, расположенная параллельно боковой поверхности того органа, в котором она находится (камбий). Интеркалярная меристема — образовательная ткань, расположена на некотором расстоянии от апикальной меристемы (междоузлия, основание листа). Части их также могут быть использованы в качестве эксплантов в работах по клонированию ценного генетического материала в конкретной стадии развития растений, например, у разных культур злаков и других видов. Клетки, происходящие из них, развиваются, превращаясь в разные специализированные.

В центре стебля растений находятся клетки сердцевины — округлые или многогранные паренхимные клетки — элементы основной ткани, заполненные воздухом, иногда — запасными питательными веществами, различными кристаллами и таннинами. Стенки их могут быть одревесневшими. Древесину и луб пронизывают радиальные лучи, клетки которых являются производными камбия и выполняют

запасную функцию. В мякоти листа находится основная ткань — клетки с тонкими оболочками и большим количеством зелёных пластид — хлоропластов. В этих клетках происходит фотосинтез. Их верхние слои — столбчатая паренхима. Нижние слои — межклетники, заполненные воздухом, — губчатая паренхима, состоящая из пучков механической и проводящей тканей. Краткое описание строения стебля и листа показывает разнообразие по величине, форме, строению и функциям клеток у одного и того же растения. У разных видов можно встретить большое многообразие клеток. Как правило, клетки одноименных тканей у разных видов растений имеют сходство, поскольку выполняют аналогичные функции. **Отличительные черты клеток связаны с их специальными функциями.** Так, клетки, специализированные в механической функции, имеют утолщенные и часто одревесневшие оболочки. Специализация в фотосинтезе ведет к появлению в клетках хлоропластов, а в проводящей функции — связана с их удлинением, с утратой протопласта. Для клеток, специализированных в защитной функции, характерны многообразные изменения внешних стенок (волоски) и способность вырабатывать защитные химические вещества.

Специализация в запасной функции клеток выражается в их способности накапливать питательные вещества, что приводит к увеличению их размеров и появлению в них очень крупных вакуолей.

**В меристематических, активно делящихся клетках развиты те внутриклеточные структуры, которые обеспечивают построение составных частей клетки.** В зависимости от характера специализации клеток отдельные черты их строения развиты в разной степени. Некоторые клетки, становясь специализированными, умирают — и тогда только начинают выполнять свою специальную функцию (клетки пробки, волокна древесины, сосуды). В то же время даже отличающиеся между собой клетки обладают сходством в строении и функциях. У многоклеточных видов это связано с тем, что все клетки организма являются потомками одной клетки-родоначальницы. Поэтому, во-первых, как бы ни были специализированы клетки, они имеют общий исток происхождения. Во-вторых, общие черты в строении клеток растений разных видов связаны с тем, что все растения состоят в определённой степени родства, поскольку все они развились путем эволюции одноклеточных предков. С этим связано наличие общих черт в их строении и работе. В-третьих, сходство связано с тем, что все живые клетки, какую бы специальную функцию они ни выполня-

ли, прежде всего — должны обеспечивать свою жизнь. Они поглощают питательные вещества, строят своё тело, добывая энергию, дышат, освобождаются от ненужных веществ, борются с повреждениями, реагируют на изменения внешних условий и растут. Все эти процессы осуществляются сходно у растительных и животных клеток. **Какая-то способность, присущая всем клеткам, у специализированной клетки может развиваться сильнее, что обеспечивает выполнение ею основной специальной функции.** Рассматривая черты строения и жизнедеятельности растительных клеток, можно представить некую «типовую» клетку высшего растения, вобравшую в себя общие черты всех клеток (рис. в. 2).

К данному рисунку необходимо сделать дополнение. Снаружи растительная клетка покрыта оболочкой, неодинаковой по толщине и строению у разных её типов, образованной веществами вырабаты-

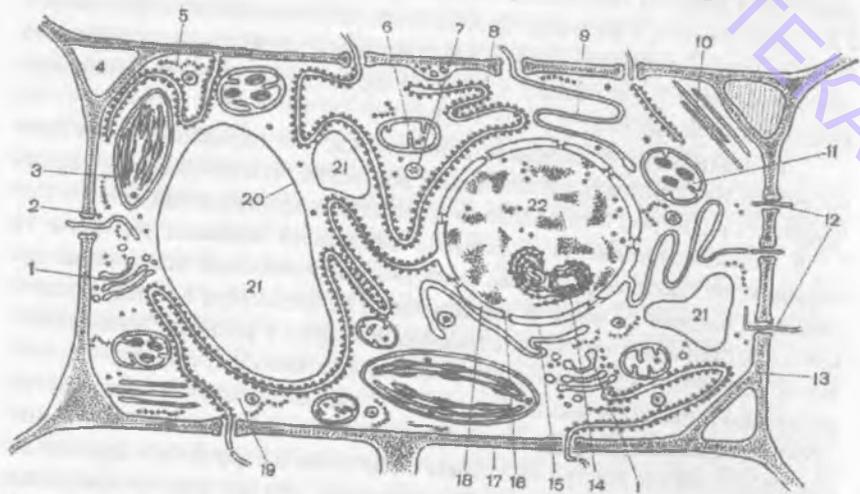


Рис. в. 2. Схема строения растительной клетки, составленная по данным электронно-микроскопического исследования разных растительных клеток: 1 — аппарат Гольджи; 2 — свободно расположенные рибосомы; 3 — хлоропласты; 4 — межклеточные пространства; 5 — полирибосомы (несколько связанных рибосом); 6 — митохондрии; 7 — лизосомы; 8 — гранулированная эндоплазматическая сеть; 9 — гладкая эндоплазматическая сеть; 10 — микротрубочки; 11 — пластиды; 12 — плазмодесмы, проходящие сквозь оболочку; 13 — клеточная оболочка; 14 — ядрышко; 15, 18 — ядерная оболочка; 16 — поры в ядерной оболочке; 17 — плазмалемма; 19 — гиалоплазма; 20 — тонопласт; 21 — вакуоли; 22 — ядро

вающимися в цитоплазме. Полисахариды — пектин, гемицеллюлоза и целлюлоза — образуют первичную оболочку, которая эластична, и по мере роста клетки растягивается и растёт. У многих клеток имеется ещё и вторичная оболочка, прочная и образующая механические и опорные ткани растения. Полисахаридная клеточная оболочка характерна только для растительной клетки, что отличает её от клеток животных.

Обмен веществ и распространение возбуждения позволяют клеткам влиять на развитие и работу друг друга. В результате — каждая ткань влияет на жизнедеятельность других, чем и создаётся координация работы всех частей растения.

Под оболочкой находится цитоплазма. Наружный её слой — поверхностная клеточная мембрана — плазмалемма, регулирующая вход и выход клеточных веществ, обеспечивает их избирательное проникновение. Другой механизм усиленного поглощения вещества клеткой состоит в связывании его белками или другими веществами. Движение веществ в этом случае происходит путем диффузии. В отличие от пассивного проникновения веществ, ферментативный транспорт нуждается в затрате энергии.

Благодаря активному транспорту ионов клетки эпидермиса корневой способны всасывать из почвы нужные растению вещества и переносить их от клетки к клетке. Этот биоток движется, являясь способом сигнализации запуска и торможения в клетках химических реакций, а также и способом регуляции внутриклеточного метаболизма растений.

Цитоплазма клетки является сложно структурированной субстанцией. Важнейшие её органоиды: митохондрии, эндоплазматический ретикулум (эндоплазматическая сеть), аппарат Гольджи, рибосомы, пластиды. Жизнь клетки — это непрерывная химическая работа её структур по поддержанию обмена веществ. Клетка вырабатывает вещества, необходимые ей для поддержания собственной жизни, для создания дочерних клеток при размножении и для нужд других клеток организма.

Часть цитоплазмы, в которую погружены органоиды, — гиалоплазма. Это работающая часть цитоплазмы. В ней происходит непрерывная химическая работа, связанная с обменом веществ.

Все химические реакции, протекающие в клетке, можно разделить на две группы. В одних — вещества распадаются на низкомолекулярные, в других — синтезируются высокомолекулярные вещества.

В гиалоплазме содержатся ферменты, расщепляющие молекулы глюкозы на молекулы пировиноградной кислоты. Освобождающаяся при этом энергия запасается в молекулах аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ). Этот же процесс протекает и в клеточном ядре.

В нужный момент в соответствующей точке клетки АТФ расщепляется и отдаёт энергию для синтеза необходимого клетке вещества. Все химические реакции, протекающие в клетке, осуществляются с помощью ферментов.

Однако основная масса энергии производится в особых органоидах цитоплазмы — митохондриях, вследствие происходящего расщепления веществ, и затем используется клеткой для разных реакций синтеза и для иной работы (электрической, механической и транспорта веществ). По своей функции — это силовые станции клетки.

Совокупность ферментов осуществляет внутриклеточное дыхание и создаёт запас освобождающейся при дыхании энергии в форме АТФ.

Их работа тесно связана с процессами расщепления глюкозы и других веществ до пировиноградной кислоты. Оболочка митохондрии образована двумя мембранами.

При биологическом окислении энергия химических связей освобождается порциями, и основная её часть переходит в энергию химической фосфатной связи АТФ. Митохондрии — мелкие тельца округлой или продолговатой формы размером 0,5–1,5 мк, построенные из липопротеиновых мембран, погружённых в клеточный матрикс (рис. в. 3).

В нужный момент митохондрия может использоваться для создания новых химических связей, для синтеза новых веществ, а также для производства других видов работы — электрической, механической, транспорта веществ из внешней среды в клетку и обратно. Чем активнее жизнедеятельность клетки, тем больше в ней митохондрий.

Эндоплазматический ретикулум (ЭР) — органоид цитоплазмы, в котором происходит синтез многих веществ. Кроме того, что он является конвейером ферментативного превращения веществ, главным образом — для их синтеза, он ещё представляет собой и систему магистралей, по которым вещества перемещаются. Начинается ретикулум от наружной мембраны оболочки ядра и подходит к различным органоидам цитоплазмы, а также к плазмалемме, связывая между собой все части клетки. Кроме того, его каналы проходят через плазмодесмы.

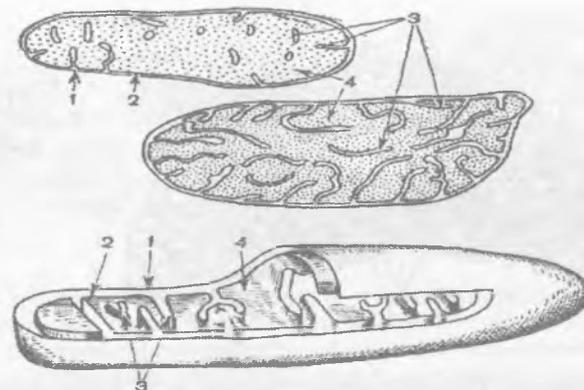


Рис. в. 3. Строение митохондрии. Вверху и в середине — вид продольного среза через митохондрию (вверху — митохондрия из эмбриональной клетки кончика корня; в середине — из клетки взрослого листа элодеи). Внизу — трёхмерная схема, на которой часть митохондрии срезана, что позволяет видеть её внутреннее строение: 1 — наружная мембрана; 2 — внутренняя мембрана; 3 — кристы; 4 — матрикс

Многие из синтезированных в клетке веществ должны быть сконцентрированы и выделены — либо в наружную среду, либо во внутриклеточную вакуоль. Клетка также концентрирует вещества, поступающие в неё из других клеток. Эту работу выполняют диктиосомы. Обычно в клетке их несколько, их совокупность называется аппаратом (комплексом) Гольджи. Каждая диктиосома представляет собой систему мембран (рис. в. 4). Полости между мембранами имеют вид узких щелей, или плоских мешочков — цистерн или пузырьков, форма которых меняется в ходе работы органоида.

Сформировавшиеся и разросшиеся пузырьки отделяются от органоида. Аппарат Гольджи особенно развит в выделительных (секреторных) клетках. Он синтезирует и выделяет вещества, образующие клеточную оболочку.

Лизосомы — мелкие (около 0,5 мк в диаметре) округлые тельца — органоиды цитоплазмы, покрытые оболочкой — липопротеиновой мембраной. Их содержимое — ферменты, переваривающие белки, углеводы, нуклеиновые кислоты и липиды. Оболочка лизосомы препятствует выходу ферментов из органоида в гиалоплазму, что в противном случае приводило бы к перевариванию их этими ферментами.

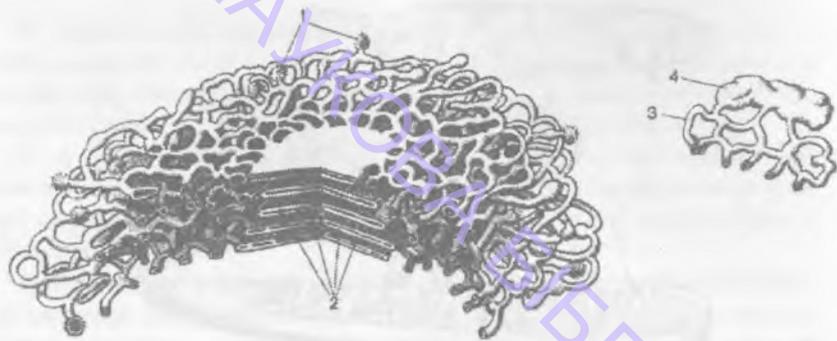


Рис. в. 4. Схематическое изображение строения части диктиосомы из растительной клетки. Слева показана часть пяти смежных цистерн. Справа — в более увеличенном виде представлено образование секретируемого аппаратом Гольджи пузырька, еще прикрепленного к разветвлениям цистерн. 1 — пузырьки; 2 — цистерны; 3 — каналы; 4 — развивающиеся пузырьки

Рибосомы — мелкие органоиды шаровидной формы с диаметром около 250 А. Одна их часть прикреплена к поверхностям мембран, образующих каналы гранулярного эндоплазматического ретикулула. Другая — находится в свободном состоянии в гиалоплазме, где их может быть до 5 млн. Это аппараты для синтеза белка, которых много в растущих клетках. Рибосомы имеются также в митохондриях и хлоропластах, где синтезируются белки, из которых они построены. Во многих клетках есть органоиды, названные микротрубочками. Они связаны с сократительной активностью цитоплазмы и её образований. В клетках, лишенных плотной оболочки, микротрубочки выполняют опорную функцию. Из них во время деления клетки образуются нити веретена.

Пластиды — органоиды, присущие растительным клеткам, крупные тельца, видимые под световым микроскопом. Их 3 типа: бесцветные — лейкопласты, зелёные — хлоропласты, окрашенные в другие цвета — хромопласты, они имеют своё строение и функции, образуются из пропластид — бесцветных телец, крупнее митохондрий, и встречаются в меристематических клетках. Хлоропласты — пластиды высших растений, в них идёт фотосинтез. Их форма — двояковыпуклая линзы размером 4–6 мк. Они находятся в паренхимных клетках листьев и других зеленых частях, их количество варьируется от 25 до 50. В состав их мембран (рис. в. 5) входит зеленый пигмент хлорофилл.

Здесь происходят световые реакции фотосинтеза — поглощение хлорофиллом лучей света и превращение их энергии в энергию

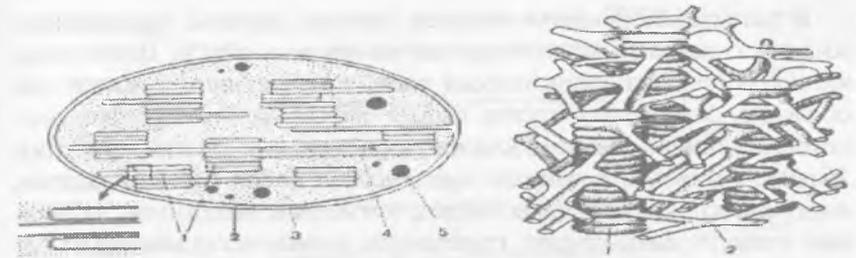


Рис. в. 5. Строение хлоропласта. Слева — продольный разрез через хлоропласт. Участок внизу показан в увеличенном виде: 1 — граны, образованные ламеллами, сложенными стопками; 2 — оболочка; 3 — строма (матрикс); 4 — ламеллы; 5 — капли жира, образовавшегося в хлоропласте. Справа — трехмерная схема расположения и взаимосвязи ламелл и гран внутри хлоропласта: 1 — граны; 2 — ламеллы

возбужденных электронов, которые её запасают и отдают на разложение воды и синтез АТФ.

Кислород выделяется в атмосферу, а водород связывается белком ферредоксином. Ферредоксин вновь окисляется, отдавая этот водород веществу-восстановителю — НАДФ, который, переходя в восстановленную форму, образует НАДФ-Н<sub>2</sub>. Таким образом, итогом световых реакций фотосинтеза является образование АТФ, НАДФ-Н<sub>2</sub> и кислорода при потреблении воды и энергии света. Продукция фотосинтеза (производимая биомасса) за год составляет на земном шаре около 1000 т. Органические вещества, создаваемые растениями, — единственный источник жизни не только для растений, но и для животных. Поскольку последние перерабатывают уже готовые органические вещества, питаюсь либо растениями, либо животными, которые питаются растениями. Таким образом, в основе всей современной жизни на Земле лежит фотосинтез.

Хлоропласты способны перемещаться по клетке и располагаться в наиболее благоприятных для фотосинтеза условиях освещения. Это — фототаксис — проявление у растений одного из видов раздражимости. Хлоропласты обладают автономией в клетке, в них имеются собственные рибосомы и набор веществ, осуществляющих синтез ряда их собственных белков. Имеются также ферменты, работа которых приводит к образованию липидов, входящих в состав ламелл и хлорофилла. Хлоропласты располагают и автономной системой добывания энергии, благодаря чему они способны строить собственные структуры, наличие которых в растительной клетке является главным её отличием от клеток животных.

В растительной клетке имеется крупная вакуоль, наполненная жидким содержимым, занимающая почти весь объём. Цитоплазма клетки составляет лишь тонкий слой, прилегающий к клеточной оболочке. У молодых клеток бывает несколько мелких вакуолей, которые по мере развития клетки разрастаются и сливаются в одну. Жидкое содержимое вакуоли представляет собой раствор сахаров, аминокислот, органических кислот, пигментов, витаминов, дубильных веществ, алкаллоидов, гликозидов, разных неорганических солей (нитратов, фосфатов, хлоридов), а иногда — белков.

У большинства растений в каждой клетке имеется одно или несколько ядер. Клетка, лишённая ядра, способна жить лишь короткое время. Ядро находится в цитоплазме, форма его может быть округлой, овальной, вытянутой, неправильно-многолопастной. Размер ядра в клетках разных растений, как и в разных клетках одного и того же растения, неодинаков. Крупные ядра бывают в молодых, меристематических клетках и могут занимать до 3/4 их объёма. Поры и прямая связь эндоплазматической сети с околоядерным пространством обеспечивают контакт между ядром и цитоплазмой. *Содержимое ядра — зернистое вещество (ядерный сок — нуклеоплазма), в котором находятся хромосомы и ядрышко. Последнее представляет собой аппарат синтеза рибосом и место их сборки.*

Хромосомы построены из большого числа молекул дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК), соединённых с молекулами белков-гистонов. Это длинные, сложно упакованные двойные нити, заплетённые спирально, представляющие цепи из огромного числа нуклеотидов и состоящие из азотистого основания, углевода (дезоксирибозы) и фосфорной кислоты. В состав каждого из нуклеотидов входит одно из четырёх азотистых оснований: аденин, гуанин, цитозин или тимин. Соответственно им различают 4 нуклеотида: адениновый (А), гуаниновый (Г), цитозиновый (Ц) и тиминный (Т), которые соединяются между собой через фосфатные группы, образуя длинную цепочку.

Две цепочки в молекуле ДНК скреплены между собой водородными связями азотистых оснований нуклеотидов. Основания образуют пары — одно основание из одной цепочки, другое — из второй (рис. в. 6). Хотя все молекулы ДНК построены по единому плану, их качественный состав различен, и они различны по величине молекул. Молекула ДНК содержит до 50–100 тыс. пар нуклеотидов и у каждой молекулы ДНК своё количественное отношение А : Г : Ц : Т. Порядок их чередования характерен только для конкретной молекулы.

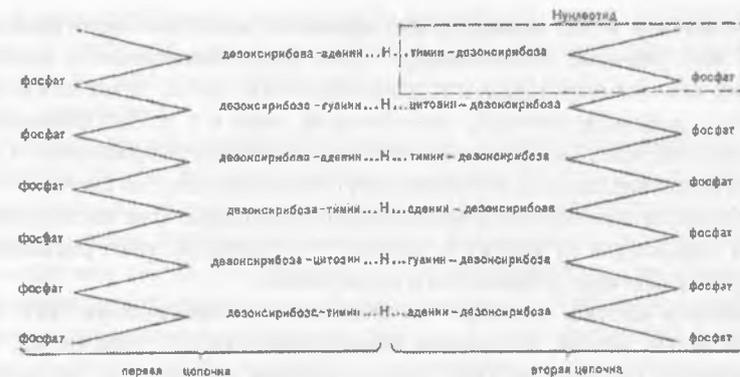


Рис. в. 6. Схема строения фрагмента молекулы ДНК. Каждая из двух цепочек образована благодаря тому, что дезоксирибозы соседних нуклеотидов соединены между собой через фосфат. Цепочки соединены друг с другом водородными (... Н ...) связями между азотистыми основаниями их нуклеотидов (-А ... Н ... Т — или — Г ... Н ... Ц -)

Молекулы ДНК могут отличаться между собой не одной-двумя парами, а огромным числом нуклеотидов.

Количество их возможных перестановок в молекуле ДНК бесконечно, и количество их молекул, у которых свои свойства, бесконечно. Последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК — это зашифрованная запись состава того или иного белка, свойственного данной клетке. Во всех молекулах ДНК хромосом ядра — записи состава всех белков клетки, которые могут синтезироваться в ней в течение всей жизни.

Молекулы каждого белка — это цепочки из последовательно соединённых 20 аминокислот. Характер белка определяется тем, из каких именно аминокислот состоит его молекула, каково их количество в ней и какова последовательность их соединения. Участок ДНК, ответственный за состав определенного белка (ген), — это запись конкретной последовательности аминокислот, образующих молекулу данного белка. Каждые 3 последовательных нуклеотида цепочки ДНК обозначают (кодируют) одну аминокислоту белковой молекулы. Количество различающихся сочетаний по 3 нуклеотида из числа четырех их видов достаточно для кодирования 20 аминокислот. В живом мире одни и те же аминокислоты кодируются одними и теми же сочетаниями нуклеотидов. В итоге — в одном гене нуклеотидным составом зашифрован аминокислотный состав белков, которые могут синтезироваться в данной клетке.

*Клеточные белки являются ферментами, определяющими протекание всех реакций, составляющих суть жизнедеятельности клеток.* От них зависит образование и превращения в клетке химических веществ — жиров, углеводов, алкалоидов, смол и т. д. Это формирует все свойства клетки, отличающие её от клеток других растений. Сведения о составе белков, которые могут образовываться в клетке — это информация о свойствах клетки и всего организма. Она наследственная и передаётся от клетки к клетке — от материнского растения к дочерним клеткам, и хранится в хромосомах.

Когда в клетке возникает потребность в образовании того или иного белка, то ген, в котором зашифрован состав этого белка, активируется. На участке ДНК, составляющем данный ген, образуются молекулы информационной рибонуклеиновой кислоты (и-РНК). Строение и состав этих молекул, представляющих собой одиночные цепочки из нуклеотидов, отображает нуклеотидное строение гена, благодаря которому они образовались. Так происходит копирование информации о составе будущего белка.

Образование молекул и-РНК (на каждом гене их образуется много) означает и размножение информации — одинаковых матриц, отображающих строение одного и того же гена, и несущих в нуклеотидной последовательности своих молекул информацию об аминокислотном составе заданного белка.

Общая схема процесса синтеза белков такова. На активированном гене — участке одной из цепочек молекулы ДНК — синтезируются нуклеотидные цепочки — молекулы и-РНК, состав их точно отображает состав гена — несёт запись кодируемого им белка. В цитоплазме на рибосоме на основе информации, перенесённой с гена молекулами и-РНК, аминокислоты с помощью транспортных РНК соединяются в заданной последовательности — и образуются молекула закодированного в гене белка. Образование молекул и-РНК на активированном гене служит командой и программой для синтеза определённого белка. Одна и та же молекула и-РНК используется для создания одинаковых молекул белка. Однако она недолговечна, и для длительно продолжающегося синтеза новых молекул того же белка необходимо образование на одном и том же гене одинаковых, новых экземпляров молекул и-РНК. С переходом гена в неактивное состояние — когда у клетки исчезает потребность в данном белке, — ген перестаёт образовывать и-РНК и синтез белка прекращается.

Каждая рибосома производит за свою жизнь много разных белков и может работать на основе любой и-РНК. Характер созданного ею белка зависит только от состава и-РНК, в контакте с которой рибосома находилась.

Таким образом, клеточное ядро выполняет разные взаимосвязанные функции. В нём хранятся сведения о составе белков, способных синтезироваться в клетке в течение всей её жизни. (Исключение составляют некоторые белки митохондрий и хлоропластов, состав которых зашифрован в ДНК тех органоидов, где они находятся. Там происходят и этапы расшифровки сведений, заключённых в ДНК, и синтез данных белков с помощью собственных рибосом.) Ядро организует в нужный момент синтез каждого белка. При делении клетки, сопровождающемся делением её ядра, вся информация в полном объёме переходит в каждое из образуемых ядер новой клетки. Это возможно благодаря тому, что перед делением весь генный материал хромосом самоудваивается, образуются два его экземпляра — по одному в каждом из новых ядер, с содержанием полного набора генов организма. В одних клетках функционирует одна их часть, в других — другая, этим клетки разных тканей организма и отличаются. Значительная часть генов остаётся в пассивном «хранящем информацию» состоянии, и они активны в клетке в определённые периоды. Генный материал находится в хромосомах. Поэтому работа ядра по хранению наследственной информации, по её удвоению и передаче из клетки в клетку, по организации синтеза различных белков в течение жизни клетки — это работа хромосом. Они в виде чётких структур различимы в ядре во время деления клетки, когда происходит конденсация их материала и их можно выявить методами микроскопии в виде палочек, крючков, овальных телец, шариков, варьирующихся в размере. Каждая клетка вида растений содержит в своём ядре одинаковый набор хромосом с определённым числом.

У высших растений в течение жизненного цикла чередуются два поколения: с клетками, содержащими в ядрах одинарный (гаплоидный,  $n$ ) набор хромосом, и с клетками, ядра которых имеют двойной (диплоидный,  $2n$ ) набор хромосом.

*Гаплоидный набор хромосом состоит из  $n$  разных хромосом, по одной каждого типа, и количество их постоянно для вида. Гаплоидные половые клетки — гаметы. Их число постоянно и в диплоидном наборе оно удваивается. (В диплоидном организме растений в пыльниках образуются гаплоидные клетки — микроспоры. Прорастая на питательной среде, в определённых условиях *in vitro*, любая микроспора может дать начало*

гаплоидному организму, который после удвоения его хромосом может представлять собой линию удвоенного гаплоида.)

Почему одни гены остаются неактивными и как включаются и выключаются другие? Считают, что большую роль в блокировании и деблокировании генов играют белки-гистоны, которые входят в состав хромосом, находясь в соединении с ДНК. Активация, «раскрепощение» гена происходит тогда, когда молекула гистона отсоединяется от соответствующего участка ДНК, позволяя цепочкам расплестись и начать функционировать химически.

Из зиготы развивается организм с диплоидным набором хромосом, в котором каждая пара одинакова по форме, строению и содержит гомологичные гены, отвечающие за проявление однородных признаков. Одна хромосома — из гаплоидного набора отцовской гаметы, другая — из материнской гаметы. У раздельнополых организмов одна из хромосом несёт гены, определяющие развитие признаков отцовского типа, вторая — материнского. Гомологичные хромосомы другой пары так же определяют развитие другого ряда признаков, третьей пары — третьего и т. д.

Гаплоидный набор, входящий в состав диплоидного, несёт отцовскую наследственность с её индивидуальными чертами из отцовской гаметы, а гаплоидный набор из материнской гаметы — материнскую. Сложное взаимодействие не всегда тождественных генов гаплоидных наборов, в сумме образующих один диплоидный, определяет признаки, которые проявятся впоследствии у диплоидного гибридного потомства.

Размножаются клетки делением — из одной образуются две дочерние. Митотическое деление ядра (митоз) — обеспечивает равное и полное распределение наследственного вещества хромосом между дочерними клетками. До деления клетки каждая молекула ДНК в хромосоме пристраивает около себя копию — вторую такую же молекулу. В результате наследственный материал клетки удваивается, и каждая хромосома теперь состоит из двух хроматид. Далее «задача» клетки — разделить каждую хромосому на хроматиды и поровну распределить их между будущими дочерними клетками: в каждую из них направить по одной хроматиде от каждой хромосомы. Для этого перед делением клетки хромосомы уплотняются и сокращаются, располагаясь в одной плоскости по экватору ядра, причём одна хроматида обращена к одному полюсу, другая — к противоположному. Ядерная оболочка исчезает, ядрышко растворяется в клеточном соке и между полюсами появляются нити веретена, одни — идут от одного полюса клетки к другому, другие нити — соединяют полюс с одной из хроматид. Далее хроматиды расходятся к

противоположным полюсам клетки, и у каждого полюса собирается по одному набору. Теперь они уже являются хромосомами. Затем нити веретена распадаются, и вокруг каждого набора хромосом образуется ядерная оболочка, хромосомы сильно разбухают (деспирализуются) и в каждом ядре появляется ядрышко. Ядро обретает структуру, свойственную ядрам неделящихся клеток. В срединной плоскости клетки образуется перегородка, делящая клетку на две дочерние (рис. в. 7).

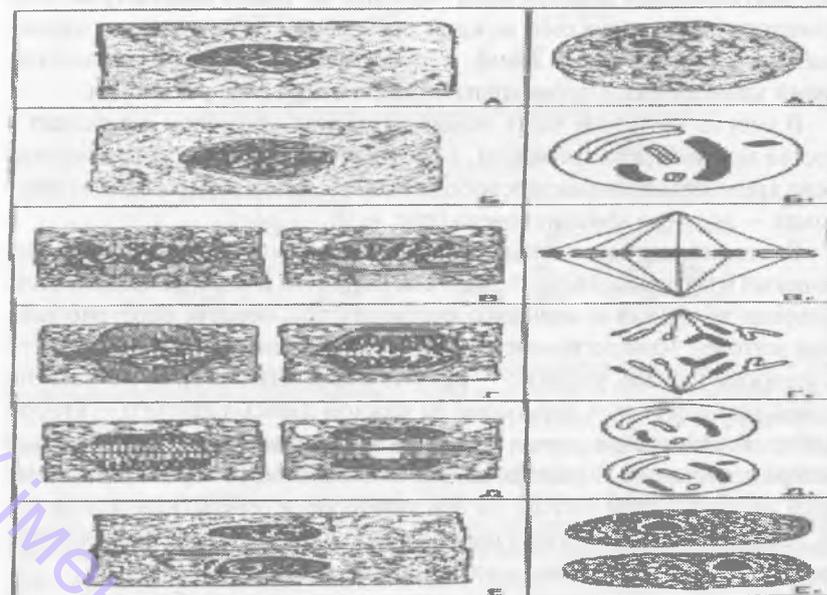


Рис. в. 7. Митотическое деление клетки кончика корешка лука (слева) и параллельно (справа) — схема деления ядра при митозе — одна из гомологичных хромосом зачернена, другая — светлая. А — клетка вне деления в интерфазе; хромосомы деспирализованы, не видны; различимы ядрышки. Б — профаз митоза: клетка готовится к делению; видны хромосомы, каждая состоит из двух хроматид. В — метафаза митоза: оболочка ядра растворяется; хромосомы располагаются в экваториальной плоскости клетки; появляются нити веретена, прикрепляющиеся к хромосомам. Г — анафаза митоза: хромосомы, расцепившись вдоль на две, расходятся к полюсам. Д — телофаза митоза: хромосомы деконденсируются, образуются ядра, покрытые оболочкой, и ядрышки; исчезают нити веретена, в середине клетки появляется фрагмобласт — оболочка, разрастаясь, перегородивает клетку на две. Е — цитокинез: образование оболочки между двумя дочерними клетками; ядра принимают интерфазный вид — как показано вначале, в положении А

Органоиды распределяются между дочерними клетками и в клетках синтезируются их составные части, происходит сборка новых органоидов каждого вида, и число их в каждой клетке восстанавливается до необходимого уровня. Клетки растут. В хромосомах происходит удвоение наследственного материала, и они состоят, как перед делением клетки, из двух хроматид. Клетка готова к новому делению.

При смене диплоидного поколения клеток гаплоидным происходит редукционное деление ядра — мейоз. Во время мейоза (рис. в. 8) гомологичные хромосомы каждой пары сближаются, и тесно прилегая друг к другу по своей длине, перекручиваются. Между гомологичными хромосомами происходит обмен отдельными участками.

В результате этого часть генов отцовских хромосом переходит в состав материнских хромосом, а соответствующие им гены материнских хромосом занимают освободившиеся места в отцовских хромосомах — явление кроссинговера (рис. в. 9).

Внешний вид хромосом не меняется, но меняется их качество. Отцовский и материнский материал смешивается и перераспределяется. Ядерная оболочка и ядрышко растворяются, образуя веретено (как при митозе). Гомологичные хромосомы разъединяются и расходятся к полюсам клетки, у одного — один гаплоидный набор хромосом (по одной гомологичной хромосоме из каждой пары), у другого — второй набор. **В мейозе образуются половые клетки микроспоры с гаплоидным набором хромосом.** Образовавшиеся *in vivo* в микроспорах гаплоидные ядра делятся путём митоза на вегетативную и генеративную клетки. И далее, каждая хромосома набора расщепляется на две расходящиеся хроматиды и образуются дочерние гаплоидные клетки.

Таким образом, показано, что клетка как единица биологической активности организма является основой его строения и жизнедеятельности. «Поведение» её в различные периоды жизни в организме растения регулируется внешними и внутренними «сигналами», что составляет основу его роста и развития. **Изменения в темпах и продолжительности времени функционирования клеток, сопровождающиеся увеличением или уменьшением их способности к делению, росту и специализации, а также иные перемены, происходящие в клеточном метаболизме растений, вызывают в клетках и тканях морфогенетические реакции.** Исследователи, проводя поиск влияющих на них факторов, разрабатывают биотехнологические приёмы, которые являются базисом для будущих биотехнологий. Манипулирование клетками растений в модельных условиях *in vitro* систем, совершенствование способов

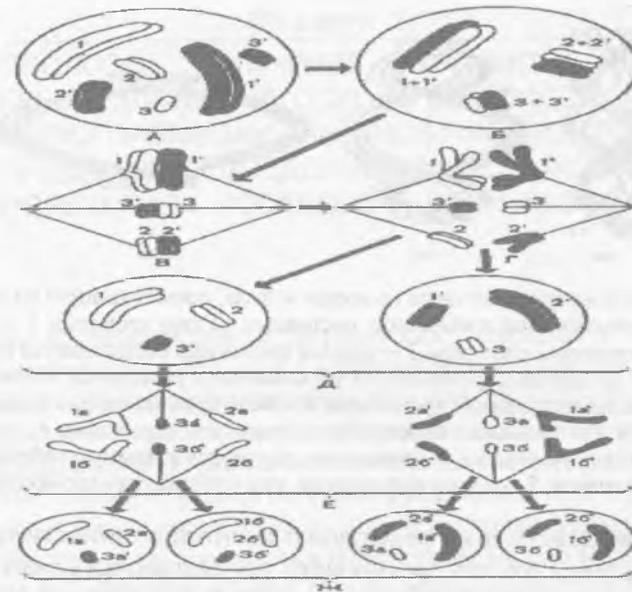


Рис. в. 8. Схема поведения хромосом «условной» клетки при мейозе: А — диплоидное ядро клетки, содержащее 3 пары хромосом (1 и 1' — 1-я пара гомологичных хромосом, 2 и 2' — 2-я пара, 3 и 3' — 3-я пара). 2n = В. 3 хромосомы, происходящие от материнского организма, — светлые (цифры без штриха); парные им гомологичные хромосомы, происходящие от отцовского организма, зачернены (цифры со штрихом). Гомологичные хромосомы обозначены общим номером. Каждая хромосома состоит из двух хроматид. Б — слияние гомологичных хромосом. На этой стадии гомологичные хромосомы обмениваются отдельными участками и при этом происходит перераспределение материнского и отцовского наследственного материала между хромосомами (кроссинговер). В — образуются нити веретена, прикрепляющиеся к хромосомам, исчезает оболочка ядра. Г — гомологичные хромосомы расходятся к противоположным полюсам клетки, и у полюсов веретена оказывается по одной гомологичной хромосоме из пары, общее число хромосом у каждого полюса вдвое меньше, чем в исходном ядре А. Д — образуются два ядра с гаплоидным набором хромосом в каждом; в одно из них попало больше (светлых, материнских по отношению к ядру А) и меньше (зачерненных, отцовских по отношению к ядру А) хромосом, в другое — наоборот; новые ядра не вполне тождественны друг другу по составу своего наследственного вещества; их различие обусловлено также и кроссинговером, происходящим с хромосомами на стадии Б. Е—Ж — митотическое деление гаплоидных ядер. Д — продольное расщепление каждой хромосомы, расхождение хромосом к полюсам, образование двух гаплоидных ядер из каждого ядра. В итоге появилось 4 клетки с гаплоидными ядрами вместо одной с диплоидным набором хромосом

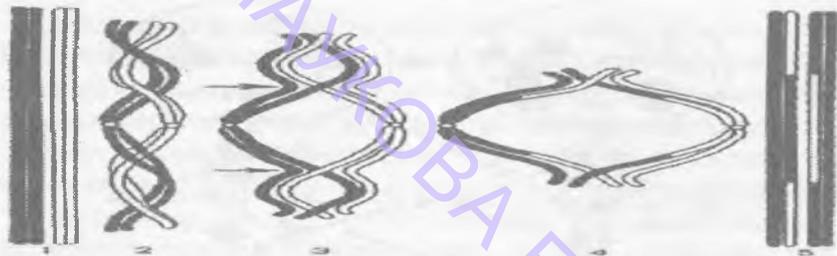


Рис. в. 9. Схема кроссинговера во время мейоза, происходящего на стадии Б: 1 — две гомологичные хромосомы, состоящие из двух хроматид; 2 — гомологичные хромосомы сплелись; 3 — каждая хромосома расщепляется на составляющие её хроматиды; хромосомы отталкиваются и расходятся; в центральной петле сдвоены сестринские хроматиды, а в обеих крайних петлях — несестринские; точки, где возможен кроссинговер, показаны стрелками; 4 — хроматиды обменялись участками, и хромосомы, претерпев взаимную гибридизацию, расходятся; 5 — две разошедшиеся, уже «гибридные» хромосомы

и путей воздействия на реализацию их тотипотентности позволит исследователям создать предпосылки для разработки новых эффективных биотехнологий, ориентированных на решение конкретных селекционно-генетических задач по улучшению экономически важных видов.

## Раздел 1

БИОТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ЛИНЕЙНОГО МАТЕРИАЛА ХЛЕБНЫХ ЗЛАКОВ НА ОСНОВЕ ГАПЛОИДОВ, ИХ ВОЗМОЖНОСТИ, ПРОБЛЕМЫ, ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ПРОЦЕССА ГАПЛОПРОДУКЦИИ У ВОЗДЕЛЫВАЕМЫХ ЗЛАКОВ В РАБОТАХ, ПРОВЕДЕННЫХ ИССЛЕДОВАТЕЛЯМИ РАЗНЫХ СТРАН

Одним из перспективных методических подходов к изучению функционирования различных клеточных механизмов и индукции в тканях растений морфогенетических реакций, происходящих вследствие их роста и развития при воздействии на них разных экзо- и эндогенных факторов, является использование систем культивирования клеток, тканей и органов растений в условиях *in vitro*. В разных их вариантах, в зависимости от экспланта, в контролируемых условиях для поддержания его жизненных параметров, можно моделировать процессы дедифференцировки специализированной клетки и наблюдать превращение её в калусную или опухолевую. И, далее — на основе тотипотентности клеток (способность полностью реализовать генетическую программу развития с образованием целого растения) достигать регенерации образованных в условиях *in vitro* клеточных комплексов. Т. е. осуществлять переход от неорганизованного роста клеток калусной массы к её дифференцировке через реализацию разных морфогенетических путей: соматического эмбриогенеза, органогенеза и флорального морфогенеза. И затем в определённых условиях для каждой конкретной системы *in vitro* дать начало новому растительному организму. Все описанные процессы лежат в основе создания биотехнологий для улучшения культурных растений и получения их новых генетических форм.

Так, для ускоренного создания перспективного исходного линейного генетического материала, стабильных и линейных сортов злаков необходимы надёжные и эффективные способы получения гомозиготных линий. В этом аспекте гаплоидия является наиболее привлекательной областью работы для биотехнологов. Во первых, из-за высокого потенциала возможностей, которыми отличаются имеющиеся в арсенале исследователей методы, а также из-за доступности и относительной простоты осуществления процессов, лежащих в их основе.

### 1.1. МЕТОД КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПЫЛЬНИКОВ *IN VITRO* — ГАПЛОПРОДУКЦИОННАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГОМОЗИГОТНОГО МАТЕРИАЛА ЭКОНОМИЧЕСКИ ВАЖНЫХ ВИДОВ ЗЛАКОВ: ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЕЁ РЕЗУЛЬТАТИВНОСТЬ, ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ РАЗНЫМИ АВТОРАМИ В ГЕНЕТИКЕ И СЕЛЕКЦИИ ЭТИХ КУЛЬТУР

Одним из методов *in vitro*, являющихся основой широко развивающейся гаплоидной технологии у различных видов растений, является культура пыльников. Существует мнение, что, исходя из количества микроспор в пыльниках, получение гаплоидов через микроспору — потенциально самая эффективная система *in vitro* для производства гомозиготного материала, в сравнении с традиционным методом инбридинга и с другими известными методами [3, 4, 5, 6]. Вследствие особого значения хлебных злаков, работы в этом направлении на представителях семейства злаковых — видах трибы Triticeae развивались наиболее успешно на пшенице и различных гибридах на её основе.

Представление о сущности гаплопродукционного процесса было сформулировано на основании экспериментальных результатов, полученных в работе с разными видами семейства злаковых. Суть её состоит в том, что гаплоиды из микроспор образуются, когда их основная масса в пыльнике находится в периоде развития от ранней фазы до начала первого митоза её ядра [11]. Т. е. в данном физиологическом состоянии у микроспор в условиях *in vitro* проявляется наиболее высокая компетентность к переключению их развития с гаметофитного пути на спорофитный. На то, каков процент таких микроспор в пыльнике различных видов и какими путями они реализуют свой морфогенный потенциал, — существуют разные мнения исследователей [12].

Считают, что в пыльниках в результате функционирования различных морфогенетических путей проходит процесс морфогенеза микроспор, ведущий к появлению микро- и макроструктур, а затем после их регенерации — к образованию гаплоидных растений — главных результирующих компонентов андрогенеза. Высказано мнение, что изменение нормального гаметофитного пути развития микроспор в пыльниках происходит при изменении условий их жизнеобеспечения, и это предопределено им генетической природой ещё *in vivo* периоде [14, 15].

Так, Sunderland [16] считает, что индукцию эмбриогенной активности микроспор можно стимулировать *in vivo*, а в условиях *in vitro*

под воздействием экзо- и эндогенных факторов определится уже её дальнейшее развитие по спорофитной программе.

Развитие данного процесса начинается в микроспорах в пыльниках с первых дней их культивирования *in vitro* и активно продолжается в течение первой декады их пребывания на питательной среде. Исследователями классифицируется этот период как этап развития путей морфогенеза микроспор по спорофитной программе. Их изучение в условиях *in vitro* проведено исследователями у разных злаков. У кукурузы — группой китайских учёных [16] и Miao et al. [18], у ячменя — Sunderland et al. [19, 39], у риса — Chen [20], у тритикале — Ono, Larter [21], у пшеницы — Chu et al., Wang et al. [22, 23], у овса — Rines [60].

Исследователи считают, что выявление закономерностей прохождения этого этапа у разных культур необходимо для познания сути механизма, осуществляющего индукцию перехода развития микроспор

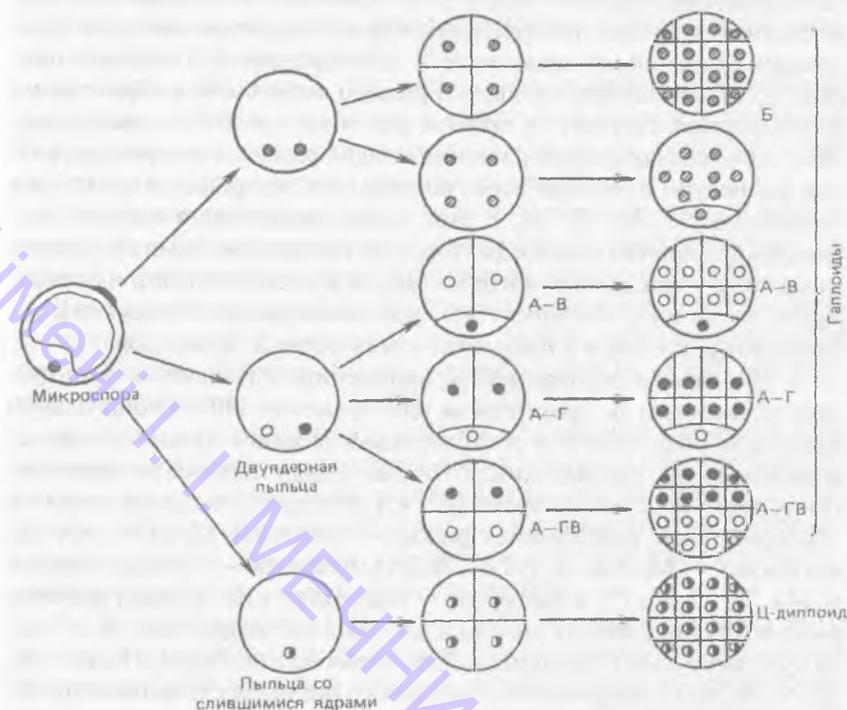


Рис. 1.1. Схема развития микроспор злаков по спорофитному типу

на спорофитный путь. Затем уже следует определение эффективных триггеров этого переключения и создание условий для прохождения наиболее результативного спорофитного пути [24, 29]. Одним из авторов приведенных выше работ выдвинуто положение о том, что направление путей развития микроспор (А, В, С, D, E), описанных в литературе, определяется первым и вторым митотическими делениями микроспор (рис. 1.1) [282]. По многочисленным данным, в течение морфогенеза в культуре пыльников злаков, как правило, обнаруживается развитие всех 5 указанных путей, но частота их встречаемости широко варьируется в зависимости от вида [10, 24, 25, 26, 27, 28, 32].

При изучении развития микроспор в культуре пыльников тритикале наблюдали А-, В- и С-пути [33]. Показано, что у *T. aestivum* [22, 23] индукция морфогенеза в культуре пыльников проходила А- и В-путями, но основным для образования эмбриоидов и растений исследователи называли В-путь [34]. При этом, по мнению авторов, вегетативная клетка признаётся наиболее результативной для образования растений, по сравнению — с генеративной. Получены данные, когда обе клетки проявляли равную активность в образовании многоядерных структур, и причин для этого могло быть несколько. Это — генотип донорного растения, стадия развития микроспор, разные процедуры предобработки, условия культивирования колосьев и пыльников [35, 36, 37, 38]. В этой связи представляет интерес рассмотрение влияния разных факторов на проявление компетентности микроспор у важнейших хлебных злаков в культуре *in vitro* и определение тех из них, что вносят максимальный вклад в продукцию гаплоидных растений и в получение гомозиготных диплоидов.

В 70-х годах в экспериментах на пшенице китайские и французские исследователи практически одновременно [40, 41] определили ключевую роль генотипа в гаплопродукционном процессе, происходящем в культуре пыльников. Он был назван главным детерминантом успеха и другими авторами [42, 43]. Это нашло подтверждение и у исследователей, работавших с рисом, — Nitsch [44, 60, 61, 62, 63, 65], кукурузой — Miao et al. [18, 69, 70, 261], ячменем — Foroughi-Wehr et al. [45, 73, 75, 76, 77] и тритикале — Ono, Larter [21]. К этому времени количество получаемых растений не выходило за пределы 1 % от числа культивируемых пыльников. После сообщения Picard и Buysler [46, 88] о том, что у полученного удвоенного гаплоида пшеницы способность к гаплопродукции была увеличена по сравнению с исходным сортом, роль генотипа как фактора, обеспечивающего успешное про-

хождение андрогенеза, окончательно утвердилась. И наступил период поиска генетических детерминант процесса.

В результате анализа данных, полученных к тому времени, исследователями был сделан главный вывод — в любом наборе генотипов в конкретных условиях работы можно выделить образцы с минимальным и максимальным уровнем проявления каждого из компонентов андрогенеза. Было показано, что на морфогенную способность пыльников оказывает влияние тип развития донорного растения и даже отдельные гены (*Vrn*), определяющие продолжительность яровизационного периода у пшеницы [34]. По частоте индукции морфогенных структур и по выходу растений в гаплоидном статусе генотипы яровой пшеницы находились на более высоком уровне, чем озимые [47].

У ячменя, как и у тритикале, наиболее результативными в продукции гаплоидов были озимые генотипы [48, 79]. У пшеницы и ячменя гибриды первого поколения показывали лучшую гаплопродукционную способность, чем сорта [39, 49].

По данным Wang et al. [50], межродовые и межвидовые гибриды пшеницы в культуре пыльников превосходили исходных партнёров. Линии пшеницы, полученные из гаплоидов, были лучше исходных сортов по всем параметрам гаплопродукции [38, 51].

Инбредные сорта пшеницы (созданные традиционными методами) по способности к продукции удвоенных гаплоидов уступали линиям, полученным на основе гаплоидов из этих же сортов [52].

У риса различие по выходу растений из пыльников отмечено между сортами подвидов Japonica и Indica. Наблюдалось преимущество сортов подвида Japonica [53] над сортами Indica по общей результативности процесса.

Выявление генотипических различий у злаковых культур по проявлению морфогенетических реакций в условиях *in vitro* и деление генотипов на «способные и неспособные» к их проявлению [48, 53, 54], а также наблюдающиеся отличия по «отзывчивости» у реципрокных гибридов [55, 56], указывало на генетическую обусловленность «отзывчивости» генотипов в культуре пыльников.

Так, в экспериментах Lazar et al. [56] в поколениях линий, полученных от скрещивания различных по «отзывчивости» генотипов пшеницы, были отмечены эффекты ядерных генов, которые проявлялись аддитивно и доминантно. Этим автором [58] при изучении эффективности гаплопродукции на материале линий пшеницы Chines

Spring, дополненных хромосомами ржи, было обнаружено влияние ржаных хромосом — 4R на общий результат, а хромосом 6R и 1R — на регенерацию. При использовании методов генетического анализа на расщепляющихся и нерасщепляющихся популяциях пшеницы [60] выявлен полигенный характер наследования признаков в культуре пыльников, объединённых понятием «способность к культивированию *in vitro*».

На основании данных скрининга генотипов кукурузы на «отзывчивость» в культуре пыльников Buter [64] пришёл к заключению, что у кукурузы варибельность по данному свойству значительно уступает таковой ячменя и пшеницы. И потому генетическая компонента для кукурузы является важным фактором. Этот довод подтверждается аддитивным эффектом генов [64] и указывает на то, что «отзывчивость» кукурузы в культуре пыльников имеет полигенный характер. По мнению автора, эта система *in vitro* является селективной для аккумуляции генов, с помощью которых можно увеличивать её результативность у кукурузы, на что указывают и другие исследователи [66, 67, 261].

Использование молекулярных маркеров в RFLP-анализе дало возможность идентифицировать QTL-локусы генных компонентов у высокоотзывчивых генотипов кукурузы, корреляция которых отмечалась лишь со способностью к образованию эмбрионных структур, но не с их регенерацией. В результате этой работы 3-я и 9-я хромосомы определены местом локализации двух главных рецессивных эпистатических генов, а 1-я и 10-я хромосомы — локусом двух митохондриальных генов, которые вместе могут объяснить 57 % варибельности изучаемого признака у кукурузы [68].

Однако генетический анализ, проведенный другими исследователями, подтвердил наличие двух районов с лучшими аллелями — на 1-й и 3-й хромосомах и ещё четыре района — на 2-й, 6-й и 8-й хромосомах. Результаты позволили сделать вывод, что потенциальная способность к образованию эмбрионных структур более важна для конечного результата, чем регенерация. Возможно также появление трансгрессий по указанному свойству в сторону лучшего родителя [70].

У ячменя полученные данные по параметрам эффективности процесса культуры пыльников явно свидетельствовали о проявлении генотипических различий на всех этапах процесса [30, 45, 71, 72, 74, 75]. Проведение исследователями различных скрещиваний выявило эффект доминирования высокой отзывчивости от лучшего родите-

ля, а реципрочные гибриды показали влияние цитоплазматического компонента на отдельные этапы морфогенеза. Использование RAPD-анализа позволило провести на ячмене изучение локализации различных количественных признаков, контролируемых несколькими генами. Так, при использовании ДНК-маркеров в сочетании с генетическим анализом, Andersen et al. в 1995 году [цит. по 78] было показано, что способность к образованию зелёных растений у ячменя в культуре пыльников может быть определена действием двух генов. Один из которых ассоциирован с геном, контролирующим яровой/озимый тип развития. Определены два локуса, контролирующие отношение зелёных/альбиносных растений. Детектирован генный продукт этого признака у отзывчивого генотипа Igr1 и установлено сильное сцепление RAPD-маркера с QTL, определяющими продукцию зелёных растений [78]. В другой работе [79] показано наличие 2 локусов на хромосомах 2Н и 4Н, также связанных с проявлением признаков «отзывчивости» в культуре пыльников. Три локуса на хромосомах 2Н и 3Н были связаны с регенерацией растений, а на хромосоме 4Н был выявлен район локуса, который ассоциируется с частотой спонтанной диплоидизации регенерантов.

На основе большой варибельности по отзывчивости среди образцов тритикале любой плоидности генетическая структура донора признаётся исследователями главным фактором успеха при получении растений в культуре пыльников тритикале [33, 80, 81]. Исходя из полученных данных сделано утверждение [80], что формирование эмбрионных структур из микроспор и процесс регенерации растений генетически контролируются. Первый этап определяется ядерной наследственностью с аддитивными эффектами. В то время как генетический контроль этапа регенерации представляется сложным, и потому пока слабо изучен [81]. Из данных по генетическому контролю индукции новообразований следует, что сверхдоминирование является главной особенностью генетического контроля признака индукции новообразований у тритикале. Появление позитивных трансгрессий по этому признаку указывало на аддитивный эффект генов. Считают, что поскольку тритикале является синтетической культурой на основе пшеницы, то об её отзывчивости в культуре пыльников в определённой мере можно судить по этому родительскому компоненту. Это важно для улучшения генетической стабильности получаемых первичных форм тритикале, которую можно достичь через культуру пыльников [82].

Пшеница, как наиболее изученная в различных генетических аспектах злаковая культура, является основным объектом для познания генетики признаков андрогенеза. Считают, что именно это может помочь открыть пути к формированию теоретической основы улучшения метода.

Исследователи [36, 42], изучая в культуре пыльников различия среди генотипов мягкой пшеницы по признакам «образование каллуса и частота возникновения зелёных растений», выявили, что линии удвоенных гаплоидов из  $F_1$ -поколения, полученного от скрещивания гибрида с одной из его родительских форм, в последующих своих поколениях показывали по этим признакам не соответствующее закону Менделя расщепление. Выделялось три типа растений с различной степенью частоты индукции признаков — выше и ниже, чем у родителей, и промежуточный тип — когда все потомки по их значениям были ниже, чем у родительских линий. Это было подтверждено и дополнено другими исследователями [55, 84], и показано, что проявление андрогенной способности в  $F_1$ -гибридах не зависит от материнской цитоплазмы родительских форм. Индукция пыльцевого каллуса и регенерация зелёных растений являются наследуемыми характеристиками и контролируются как количественные признаки.

После анализа результатов культуры пыльников у замещённых линий пшеницы CS/Cheyenne, Szakacs et al. [85] обнаружили, что индукция каллуса, регенерация растений в целом и регенерация зелёных растений контролируются мультигенами. Эти независимо наследуемые характеристики связаны с 7A- и 1B-, 3A- и 2D-хромосомами, соответственно [96]. Затем группа исследователей Agache et al. [86], на основе генетического анализа отзывчивости в культуре пыльников анеуплоидных, замещённых и транслокационных линий пшеницы, ещё раз подтвердила наличие независимо мультигенного контроля наследования признаков «образование каллуса и индукция зелёных растений». Сорты, которым была присуща высокая частота регенерации, и которые при скрещивании с мало отзывчивыми генотипами привносили в  $F_1$ -гибриды более высокую индукцию образования каллуса и зелёных растений, были названы авторами «bridge varieties» — мостовыми. По их мнению, эти формы можно использовать для улучшения результативности работы по гаплоидии пшеницы.

За последние несколько лет на пшенице были получены результаты, поддерживающие генетическую основу андрогенеза. Югославская группа исследователей Kondic et al. [89] представила данные по «отзывчивости» генотипа в культуре пыльников у исследованных ими 30 сортов мягкой пшеницы и их гибридов. «Отзывчивость» находилась под контролем аддитивного действия генов с эффектами доминирования и гетерозиса. Группа учёных, Torp et al. [90], выдвинула аргумент, что отдельные гены вряд ли важны для процесса регенерации, вероятней всего — это множественный фактор, расположенный дискретно на разных хромосомах. В доказательство этому приведены данные по QTL, которые, по мнению этих исследователей, оказывают влияние на способность к регенерации зелёных растений и локализованы на хромосомах 2A, 2B, 3A, 5B.

В другой работе представлено, что на хромосоме 5BL определены QTL, объясняющие 31,8 % регенерации зелёных растений, а на хромосоме 4B были определены и выделены сегменты, имеющие отношение к образованию эмбрионидных структур [93].

Одной из первых работ, в которой убедительно показана роль материнского генотипа в проявлении гибридами признаков «отзывчивости» в культуре пыльников пшеницы, считается работа Lazar et al. [56]. После тестирования пяти сортов яровой пшеницы и их реципрокных гибридов по индукции каллусов, формированию эмбрионидов и регенерации растений, кроме определения аддитивных и доминантных ядерных эффектов, было показано влияние материнской формы на проявление этих признаков. Все эффекты по уровню были значимыми. В 90-х годах на специально созданном генетическом материале пшеницы проведены эксперименты в культуре пыльников по изучению взаимовлияния ядра и цитоплазмы донорных генотипов [87, 96].

Так, при сравнении [91] «ответа» пыльников двух сортов пшеницы *T. aestivum* и аллоплазматических линий с цитоплазмой восьми видов рода *Aegilops* выявлен наибольший выход эмбрионидных структур у генотипов с цитоплазмами *A. kotschyi* и *A. juvepalis*, показавших, однако, низкий уровень индукции спорофитного пути на этапе первых делений. В то время как на регенерацию растений влияния не обнаружено. Не наблюдалось и ядерно-плазменных взаимодействий. Однако в культуре пыльников различных сортов мягкой пшеницы и реципроков от скрещивания лучших по отзывчивости сортов с аллоплазматическими линиями с цитоплазмой *Aegilops* [92] продемон-

стрировано проявление цитоплазматического эффекта по индукции каллусов и регенерации растений. Сделано заключение о том, что цитоплазма микроспор находится во взаимодействии с ядерными генами, оказывая определённое для каждой комбинации влияние на уровень основных компонентов процесса андрогенеза. Шерер [34], изучая отзывчивость пыльников 27 аллоплазматических линий C. Spring в культуре *in vitro*, определила, что цитоплазмы A. sharonensis, A. biunciales, A. columnaris, A. kotschii, A. crassa 4x и A. crassa 6x увеличивают способность пыльников к эмбриогенезу, а цитоплазмы T. dicoccoides, T. dicoccum, A. umbellulata, A. speltoides, A. variabilis, A. ventricosa и A. juvenalis повышают частоту образования зелёных регенерантов. Цитоплазма A. aucheri в генотипах в этих экспериментах способствовала регенерации только альбиносных растений.

Исследуя взаимодействие генома и плазмона при изучении морфогенетических реакций в культуре пыльников пшеницы, Орлов [87, 94] выявил влияние некоторых цитоплазм на частоту индукции эмбриоидов и появление регенерантов и пришёл к выводу о зависимости компонентов процесса андрогенеза от конкретной ядерно-цитоплазматической комбинации у партнёров. Затем были представлены данные по 90 аллоплазматическим линиям пшеницы [95]. Проведя изучение первых стадий морфогенеза в культуре изолированных микроспор пшеницы (аллоплазматической линии turgidum x M808), Орлов представил чёткое доказательство позитивного влияния цитоплазмы на ранние стадии пыльцевого эмбриогенеза [87]. Далее, он отметил факт, что замещение собственной цитоплазмы линии T. turgidum на чужеродную в большинстве случаев приводит к снижению экспрессии признаков морфогенетической активности у этого генотипа в культуре пыльников.

Таким образом, в настоящее время интерес к проблеме генетической природы андрогенеза пшеницы реализуется в результатах, полученных при использовании классических методов генетического анализа и современных методов молекулярного маркирования локусов генного контроля на разных хромосомах трёх геномов этого вида.

Основной причиной интенсивных исследований в этом направлении является поиск контроля механизмов этапов гаплопродукционного процесса с целью решения главной проблемы — возможности работы с любым генотипом при постановке практических задач селекции. Поскольку имеется необходимость преодоления вариабельности по отзывчивости между растениями сорта, среди колосьев

одного растения, между пыльниками в цветке и микроспорами в пыльнике, каждая группа исследователей стремится создать рабочие коллекции генетических источников или доноров высокой отзывчивости в культуре пыльников *in vitro*. И затем, изучая их, большое внимание уделяет исследованиям физиологической стороны процесса гаплопродукции [59, 86, 97, 113, 121, 143].

Все составляющие процесса получения линий из гаплоидов — условия выращивания донорного материала, формобразовательный процесс микроспор в условиях *in vitro*, ведущий к получению гаплоидных растений, а также доведение гаплоидов до статуса диплоида, требуют поддержания в данной системе определённых параметров. И в связи с этим актуальным является вопрос о норме реакции генотипа на предложенные условия, поскольку комплексное взаимодействие этих факторов может изменять направление развития любого из этапов и этим оказывать влияние на результативность морфогенеза.

Результаты исследований по изучению влияния физиологического состояния донорного генотипа на отзывчивость в культуре пыльников важнейших злаковых культур позволили их авторам считать этот фактор очень значимым для конечного результата — уровня получения удвоенных гаплоидов.

Прежде всего — это условия выращивания. Когда они не являются оптимальными, это может приводить к стерильности зрелой пыльцы и может оказать отрицательное влияние на неё ещё в стадии микроспоры. Для всех злаков компонентами этого фактора названы возраст растения, отношение к фотопериоду, интенсивность освещения, температура, сезонность и условия выращивания донорного материала, а также и обеспеченность растений питательными веществами.

На рисе [98, 100] показано, что пыльники, взятые с растений в начале периода цветения, являются более продуктивными по образованию каллуса. Указано также, что главный побег продуктивнее всех следующих [20, 112] и, по мнению одного из авторов, — это может являться следствием меньшей доступности питательных веществ к остальным побегам в кусте.

В другой работе определено, что отношение количества зелёных растений к количеству альбиносных при укорочении фотопериода увеличивалось в сторону зелёных. Каллусная индукция была более высокой при среднем и коротком фотопериоде и при относительно сниженной температуре [101]. Группой исследователей [102] не было найдено различий по скорости образования каллусов у чувствитель-

ных и нечувствительных к фотопериоду генотипов. Исследователи во главе с Huang [99, 103] доложили об отрицательном эффекте высокой температуры на регенерацию зелёных растений риса.

У кукурузы различия метода проявлялись в зависимости от выращивания донорного материала в полевых условиях и в оранжерее, и — от времени года проведения работы [104]. Из результатов проведенных экспериментов [64] последовал вывод о том, что в неблагоприятных условиях выращивания высокоотзывчивые генотипы кукурузы могут показать низкий результат по всем параметрам андрогенеза.

Mac Donald [105] добавил к этому заключению, что при выращивании донорных растений кукурузы в оранжерее за две недели до достижения микроспорами в пыльниках ранней фазы развития температура воздуха не должна быть ниже 17°C, поскольку это важно для этапа образования эмбрионидных структур.

В работе на ячмене Foroughi-Wehr et al. [71] отмечалось, что пыльники, взятые с растений из полевых условий в конце лета или на его спаде, показывают более высокий результат параметров андрогенеза. Другие авторы [106, 107] приходят к выводу, что частота индукции каллуса и регенерация растений повышались, когда пыльники брали от растений, выращенных весной или летом, в сравнении с условиями выращивания в оранжерее зимой. А если растения-доноры выращивались в климатической камере, то интенсивность освещения, близкая к 20 тыс. люкс, способствовала лучшему результату. Немаловажной является температура во время роста доноров. Высокие результаты получены, когда дневная температура была 12°, а ночная — 5 °C [108].

В опытах исследователей на пыльниках тритикале из полевого материала и искусственного климата получены неоднозначные выводы. Руорру [80], изучая отзывчивость генотипов, выращенных в поле и в оранжерее, получил лучший результат по основным параметрам андрогенеза от полевых растений.

Лукьянюк [33], изучив большой набор генотипов тритикале, пришла к выводу, что полевые условия южной зоны Украины наиболее благоприятны для культуры пыльников озимых образцов, выколашивающихся в ранние сроки. Количество образованных зелёных растений у этих растений оказывалось выше. Сравнивая отзывчивость яровых и озимых генотипов в искусственных условиях, автор показала, что все образцы-доноры дают ответ лучше по всем параметрам

культуры пыльников, когда выращиваются в условиях фитотрона: при 16-часовом фотопериоде, при температуре — дневной 18 °C и ночной 14 °C и освещённости 20 тыс. люкс.

Неотъемлемой частью работ по андрогенной гаплоидии пшеницы является изучение роли физиологического состояния донорных растений как одного из важнейших факторов, вносящего вклад в успех гаплопродукции. Причём для яровых сортов полевые условия зоны выращивания оказывались наиболее благоприятными, чем тепличные, что впоследствии оказывало положительный эффект на индукцию эмбрионидных структур из микроспор, и далее — на регенерацию зелёных растений [47, 83, 142].

В работе Ouyang et al. [109] было проведено сравнительное изучение различных условий выращивания. Высказано предположение об отрицательном влиянии условий оранжереи на метаболизм пыльников, обращено внимание на необходимость обязательного пребывания донорного материала пшеницы при пониженной температуре в период формирования генеративных органов. Hoffman et al. [110], сравнивая результаты гаплопродукции двух сортов пшеницы, выращенных в поле, в условиях оранжереи и в климатической камере, выявил преимущественное положительное влияние полевых условий. Однако Vjornstad et al. [111] показал, что подбором комфортных условий для роста растений в фитотроне можно также достичь высоких результатов, поскольку это способствует селекции жизнеспособных микроспор и проявлению ими повышенного уровня тотипотентности в культуре *in vitro* [114].

В связи с этим актуальным является вопрос о стадии развития микроспор в пыльниках при отборе материала для культивирования. По мнению исследователей, независимо от вида злака, стадия (фаза) развития микроспор является критическим фактором процесса андрогенеза. Проведя сопоставление результатов, описанных авторами на разных видах, и сделав собственные наблюдения, Sunderland и Dunwell [115], а также Nitsch [129], пришли к заключению, что фаз развития микроспор, из которых они могут развиваться в эмбрионидную структуру, может быть несколько. Экспрессия их зависит от вида растения, и именно это определяет разнообразие путей андрогенеза и их эффективность [125, 128, 130].

У риса оптимальной для проявления максимальной отзывчивости генотипов в культуре пыльников является средняя фаза развития микроспоры [116]. Автор считает, что способность каллусов, полу-

ченных из пыльников риса, давать регенерацию зелёных растений детерминирована стадией микроспоры. Каллусы, образованные из микроспор, находящихся на поздних фазах развития, проявляют низкую способность к регенерации зелёных растений и с повышенной частотой образуют бесхлорофильные регенеранты. Ряд исследователей получили успешные результаты, культивируя пыльники на всех фазах развития микроспор — от самой ранней фазы одноядерной и до ранней фазы двуядерной (сразу же после первого митотического деления). Однако максимум выхода растений из пыльников наблюдался только на средней фазе [117].

У кукурузы в этом плане лучшим по результату оказался вариант на одноядерной стадии микроспор [64, 118].

Ячмень, благодаря работам Sunderland [24, 28, 119], является наиболее изученным объектом с оптимальной для работы фазой развития микроспор в культуре пыльников. По его мнению, все растения могут быть сгруппированы в условные классы по содержанию в них наиболее компетентных для вступления в результивный морфогенез микроспор, определяющий появление зелёных гаплоидных растений. Таким классом для ячменя является «премитотический класс, стадия 2» — когда микроспора находится в интервале нескольких часов после тетрады и до первого митоза. Gaul et al. [120], проведя тщательное изучение влияния стадии развития пыльников ячменя, установили, что период их развития — интервал от завершившейся тетрады, незадолго до начала первого митотического деления ядра микроспоры (т. е. вакуолизированная), является наиболее оптимальным периодом развития растений для андрогенеза. Затем Sunderland [28], расширив набор генотипов злаков в своих исследованиях, пришёл к заключению, что у микроспор ячменя после первого митоза растения могут возникать из вегетативной и генеративной клеток и иметь различную пloidность.

Изучение оптимальной стадии микроспор для культуры пыльников тритикале проводилось каждой группой исследователей, ставивших своей целью получение гаплоидных растений. Различные авторы, экспериментируя с культурой пыльников, пришли к мнению, что выявленные Sunderland закономерности «поведения» микроспор в культуре пыльников ячменя вполне могут быть отнесены к тритикале. И потому в проводимых экспериментах с культурой пыльников тритикале оптимальным вариантом считали среднюю или позднюю фазы развития микроспоры.

В работах китайских учёных [42, 124, 126] детально изучен «ответ» пыльников пшеницы на предложенные условия *in vitro*, когда микроспоры в них находились на различных стадиях развития — от материнских клеток и до зрелой пыльцы. Ими было определено, что в пыльниках некоторых генотипов пшеницы формировался гаплоидный каллус, и из него получали гаплоидные зелёные растения, когда микроспоры находились в фазах развития — от ранней (в стадии мейоза) и до поздней — двуядерной микроспоры (уже после первого митоза). Если же микроспоры в пыльниках генотипов при высадке в условия *in vitro* находились на средней или поздней фазах одноядерной стадии развития, отмечалась наиболее высокая частота индукции каллусов и регенерации растений.

Так же, как и Sunderland на ячмене [119], китайские учёные [126] предложили разделить период наибольшей компетентности одноядерных микроспор пшеницы на предполагаемые фазы отзывчивости — раннюю 1 (когда микроспора ещё без поры), далее — раннюю 2 (несколько увеличенная микроспора, с намечающимся местом поры и заметно утолщённой оболочкой), среднюю, позднюю и премитотическую — одноядерные. Микроспоры охарактеризованы размером, формой, положением ядра, присутствием или отсутствием вакуоли. Конечный результат в экспериментах зависел от присутствия в пыльниках микроспор каждого из указанных уровней развития. Замечено уменьшение образования каллусов, если культивируемые пыльники не содержали микроспор на средней или поздней фазе одноядерной стадии.

При изучении «критических периодов» в развитии пыльника с целью выявления морфогенетических потенциалов его клеток и путей морфогенеза при культивировании в системе *in vitro*, исследователями был проведен детальный анализ прохождения его этапов. Были выявлены возможные, по мнению авторов, критические периоды, связанные с переключением программы развития с гаметофитного на спорофитный путь [263, 264]. Авторы работ считают оптимальной для начала развития микроспор по спорофитной программе — стадию сильновакуолизированной микроспоры. Что, по их мнению, определяется особенностями её структурной апикально-базальной организации — чётко выраженной полярностью — когда ядро микроспоры расположено строго противоположно поре. В этом физиологическом состоянии микроспора компетентна для переключения её развития по спорофитной программе — т. е. она уже готова к равному

симметричному делению, и затем — к продолжению развития по различным путям морфогенеза, в зависимости от предложенных условий культивирования *in vitro* и, в первую очередь, от гормонального состава питательной среды [263, 264]. Эти доводы убедительно доказывают роль фазы развития микроспоры как одного из критических факторов при культивировании пыльников пшеницы.

Определив основные лимитирующие факторы, которые нельзя не учитывать в работе, исследователи разных стран обратились к поиску путей активации отдельных этапов процесса андрогенеза [131, 134, 135, 235].

Работая с культурой пыльников различных злаков, исследователи смогли убедиться в позитивном влиянии пониженных температур в период формирования пыльников во время выращивания донорных растений в естественных полевых условиях и в режиме искусственного климата. Это явилось веским аргументом для использования данного фактора в работах по андрогенезу в качестве приёма увеличения эффективности гаплопродукции. Приём стал необходимым элементом при обработке донорного материала разных видов в срезанных побегах или в их частях — колосьях, соцветиях, пыльниках — ещё до высадки в условия *in vitro* для проведения этапа культивирования. Хотя механизмы влияния холодовых предобработок ещё во многом не ясны и единая теория вопроса ещё не сформирована, мнения исследователей по этому поводу в литературе высказывались и обсуждались неоднократно.

В 70-х годах Vasil и Nitsch [127] и другие [144], исходя из полученных данных на табаке и рисе, выдвинули положение, что пониженные температуры, снижая темпы метаболизма в пыльниках, производят синхронизацию развития микроспор и увеличивают их готовность к переключению на спорофитный путь. Выводы получили подтверждение в работе, проведенной на ячмене Wilson et al. [136]. На положительный эффект низкотемпературных предобработок и на частоту появления спонтанно удвоенных гаплоидных регенерантов у пшеницы указывают в своей работе Kudirka et al. [54].

В 80-х годах была предложена гипотеза, основанная на генной экспрессии [53], согласно которой предобработка холодом донорного материала или его частей отключает гены или ингибирует функцию генных продуктов (ферментов), отвечающих за гаметофитный путь развития микроспор. Прошедшие же предобработку микроспоры могут легче вступать на спорофитный путь развития. Авторы

считают, что на основе этой гипотезы можно объяснить увеличение частоты микроспор с двумя равными ядрами, которые часто наблюдаются у риса и ячменя в культуре пыльников после предобработок холодными температурами. В работе, касающейся вопросов стратегии культуры пыльников, Sunderland [130] обобщил результаты, полученные на разных видах растений, и сделал заключение, что обработка материала пониженной температурой предотвращает старение микроспор. Он предлагает рассматривать природу холодовых предобработок с точки зрения её воздействия на индукцию того или иного пути образования эмбриогенных структур, в зависимости от стадии развития микроспор в пыльниках. Затем приводит доводы в пользу использования необходимого уровня пониженной температуры 7–9 °C и времени предобработки материала для каждого объекта исследования. Им же был предложен вариант предобработки соцветий температурным стрессом 7–5 °C в течение нескольких дней, когда микроспоры в пыльниках находятся на средней фазе.

В работе других исследователей максимум отзывчивости генотипов ярового ячменя проявлялся в культуре пыльников после обработки срезанных колосьев при +5, +7 °C в течение 6–10 дней до вычленения и высадки пыльников. По данным Белинской [143], подходящим режимом для срезанных колосьев ярового ячменя при содержании их в воде является температура 4–5 °C при освещённости 15–20 тыс. люкс и 8-часовом фотопериоде в течение 3–12 суток.

Для риса оптимальный уровень температуры составлял +10 °C, и по мнению исследователей, срок предобработки его срезанных метёлок не должен выходить за пределы 7–13 суток [117].

Для срезанных метёлок кукурузы, в подходящей для работы по гаплоидии стадии развития микроспор в пыльниках, обычно используют тёмную камеру в интервале температур от 4 до 14 °C и от 7 до 14 суток хранения без помещения в какие-либо растворы [64, 132].

Для срезанных побегов тритикале на средней фазе микроспор и помещённых в воду оптимальным режимом предобработки авторами назван уровень температуры 4 °C для содержания материала от 7 до 14 суток в темноте [33, 34, 133].

Кроме воздействия пониженными температурами, позитивный эффект на индукционный период микроспор разных видов достигнут и от действия на срезанные донорные побеги повышенными температурами, так называемого теплового шока. Например, когда срезанные побеги ячменя помещали в воду при комнатной температуре

[136], или срезанные метёлки риса держали 2,5–5 часов в атмосфере, насыщенной парами воды от водяной бани с температурой 32 °С [137]. Описан положительный эффект использования 15-минутного шока 35 °С перед постановкой донорного материала риса на 7 дней для воздействия в темноте температурой 10 °С [138].

Достигнутый вышеуказанными условиями эффект предобработок донорного материала, по расчётам разных авторов, увеличивал эффективность гаплопродукции, по сравнению с контролем, в 1,5–4 раза у разных видов. Использование указанных температурных обработок имело только положительный эффект, потому они, по мнению исследователей, и являются необходимым приёмом повышения уровня отзывчивости генотипов без ухудшения темпов прохождения этапов всего процесса.

Исследователями сделаны попытки применения для предобработок и других химических веществ [84]. Например, ряд гаметоцидов вызывал увеличение отзывчивости генотипов пшеницы в работах нескольких исследователей [139, 140]. Их положительное влияние было обнаружено на отдельных этапах андрогенеза и у кукурузы [64]. Были поставлены эксперименты по выявлению влияния предобработок растворами осмотиков, таких как сахароза и полиэтиленгликоль, на каллусы из микроспор пшеницы перед регенерацией [141] и на срезанные побеги тритикале — перед культивированием пыльников [33].

Однако, несмотря на выявленный положительный результат по отзывчивости генотипов на действие всех этих веществ по скорости прохождения первых этапов андрогенеза, внимание исследователей было обращено на появление после обработок увеличенного количества хлорофиллдефектных регенерантов. Причина этого пока непонятна, необходимы дополнительные эксперименты по поиску «веществ-активаторов» проявления данного факта в работе с культурами пыльников или микроспор.

Немаловажную роль для эффективного прохождения гаплопродукционного процесса играют условия культивирования пыльников. Этот фактор представляет собой сложный комплекс — питательной среды и температурно-светового режима, сопровождающий поэтапное развитие процесса. Вначале — для благоприятного старта компетентных микроспор по спорофитной программе, затем — для реализации путей морфогенеза в новообразования и, наконец, — для завершения кульминационной стадии всего процесса — регенерации. Эти вопросы представляют особый интерес для рассмотрения,

поскольку они тесно связаны с поиском путей повышения эффективности данного процесса. Поэтому, как ни один из факторов, они подвергались значительному изменению со стороны исследователей. Потому что, во-первых, после предобработки необходимо было создать условия для прохождения индукционной фазы, а во-вторых, активизировать дальнейшее развитие процесса. Было выявлено, что если пыльники риса в момент воздействия находились в ранних стадиях развития микроспор, то количество альбиносов среди регенерантов возрастало, и их было больше — при наиболее высоком уровне температуры. Но такой зависимости не отмечали, если культивируемые пыльники находились под воздействием высокой температуры после прохождения микроспорами первого митоза в культуре *in vitro*. Или когда это воздействие проводилось в момент дифференциации пыльцевых каллусов.

Полученный на рисе результат по культивированию пыльников был подтверждён на пшенице [36, 47, 146]. Исследователями, изучавшими роль температуры при культивировании пыльников пшеницы, было замечено, что увеличение температуры инкубации пыльников до 29 °С в течение нескольких дней перед перенесением в условия оптимального культивирования (25 °С) приводит к возрастанию частоты индукции каллусов и заметно увеличивает выход зелёных растений. В то время как увеличение температуры до 33–34 °С более значительно усиливало индукцию каллусов, но при этом возрастала продукция альбинозных растений.

И, наконец, китайские исследователи [83], использовав 8-дневную инкубацию пыльников пшеницы (когда микроспоры в них находились в интервале от средней до поздней фазы одноядерной стадии) при 29–30 °С, затем продолжив их культивирование при 26 °С, получили самые высокие результаты всех показателей этапов андрогенеза в опыте по сравнению с контролем (без инкубации). После этих экспериментов использование теплового шока при проведении инкубационного периода для высаженных на питательную среду пыльников и затем — продолжение процесса их культивирования в тех же сосудах без пересадки при оптимально подобранных параметрах температуры культивирования и питательной среды — стало обязательным методическим этапом в работе с культурой пыльников *in vitro* мягкой пшеницы ярового и озимого типов.

У тритикале, по данным авторов, индукция микроспор проходила успешно, если после предобработки срезанных побегов пониженной

температурой +4 °С пыльники культивировали в темноте при 25–26 °С до формирования новообразований [33, 122, 123].

У кукурузы инкубация пыльников в постинкубационном периоде не оказалась столь необходимой для увеличения отзывчивости генотипов, как, например, у риса и пшеницы. По мнению исследователей, использование для инкубации пыльников пониженной температуры (10–14 °С) или повышенной (30–32 °С) может зависеть от генотипа и предобработки донорного материала, условий его выращивания и индивидуальных «требований» каждого образца [147]. Индукционную активность микроспор в пыльниках кукурузы удавалось достигать предобработкой пыльников, погружая их в 25 %-й раствор сахарозы на 6–8 минут перед высадкой на индукционную среду [157].

У ячменя приём температурной обработки пыльников не всегда применяется для улучшения отзывчивости, поскольку мнения о его необходимости расходятся [9, 30, 143, 148, 149]. Одни считают, что культивирование пыльников нужно проводить при 24–26 °С 3–5 недель в темноте, а затем переносить культуру на свет при 15–16-часовом фотопериоде и культивировать до окончания процесса. Другие авторы проводили культивирование при такой же температуре и неярком (50 люкс) свете, но — при коротком (9 ч) фотопериоде. Затем для прохождения процесса регенерации изменяли продолжительность дня до 14–16 часов и увеличивали интенсивность освещения [150]. Третьи важными составляющими условий культивирования эффективной культуры пыльников ячменя считали: положение пыльников на среде [151], сосуды для культивирования [30], плотность их посева на определённой площади [30, 152], консистенцию среды [18, 153], фактор её кондиционирования [30, 152, 154, 155]. Однако, как правило, генотипы ячменя реагировали неадекватно на предложенные условия культивирования.

Во многих работах, посвящённых культуре пыльников *in vitro*, начиная от первых успешных результатов на ячмене [9], на рисе [23, 158] и на пшенице [160, 161], внимание исследователей уделялось интенсивному изучению и роли средового фактора в процессе культивирования пыльников злаков. Как оказалось, индукционный период, в котором пребывали пыльники в начале гаплопродукционного процесса, является менее зависимым от питания [23, 156]. Но для этапа формирования эмбриогенных структур и непосредственно для регенерации растений питательная среда является важнейшим фактором,

от которого зависит жизнеобеспечение новообразований. Иными словами — это базис, поддерживающий прохождение и результативность всего процесса морфогенеза [159, 161, 162, 166, 185, 186].

Проведенные исследования позволили прийти к выводу, что именно высокая концентрация аммония в среде отрицательно влияет на рост каллусов из микроспор. Исходя из этого, Чу создал для риса среду N 6 [158] со сниженным содержанием сульфата аммония и высоким содержанием азотнокислого калия. Она явилась эффективной для культуры пыльников риса и других видов. По соотношению форм азота в минеральной основе, подходящим для работы с пыльниками риса, явились ещё две прописи известных сред — B5 [163] и модификация стандартной LS — среда R3 [164]. Сниженный уровень аммонийного азота сыграл решающую роль в выборе оптимальной для работы среды, в основном, для сортов риса подвида Japonica. И в то же время, снижение уровня аммонийного азота оказалось неподходящим для сортов подвида Indica. Для них была разработана модификация среды N6 [165], в которой сульфат аммония и фосфорнокислый калий полностью были заменены фосфорнокислым аммонием. Затем для отдельных генотипов потребовались модификации N6 среды, которые привели к появлению на её основе улучшенных базовых сред He-2 и He-5, Potato-2, E-10, MSN — наиболее оптимальных для подвида Indica [167, 168, 169, 170].

Другим важным компонентом среды является углеводный источник, который, выполняет в условиях *in vitro* две функции — трофическую и поддерживает необходимый осмотический потенциал в изолированных в пыльниках при культивировании. Чаще всего для этого используют сахарозу. Считают, что повышенная её концентрация важна для всех злаков на этапе организации структурных элементов морфогенеза в многоклеточных образованиях — каллусных и эмбриоидных, особенно в процессе органогенеза [9, 18, 21, 42]. Что касается риса, то оптимум концентрации сахарозы в средах, использованных разными авторами, варьируется. В одних работах лучшей для образования каллусов считали — 6 %, а на этапе дифференциации — 3 %, в других 6 % — для обоих этапов, а в процессе регенерации снижали до 4–5 % [116, 164, 171]. Есть исследователи, считающие оптимальную концентрацию сахарозы важной и для первых стадий морфогенеза микроспор риса [174]. Сделано предложение — вводить в питательную среду сахарозу в сочетании с другим источником углерода [204]. Однако подходящего углеводного источника для оптиму-

ма отзывчивости риса так и не предложено. Важным для культуры пыльников риса представляется определение оптимальной комбинации ростовых веществ и других добавок, позитивно влияющих на прохождение гаплопродукции. Из многих вариантов удалось отобрать лучший для калусной индукции и регенерации зелёных растений: 2,4-Д — 9,0 мкМ, пиклорам — 0,3 мкМ, зеатин — 0,15 мкМ, который рекомендован для различных генотипов риса [117]. Lin et al. [172] предложили свой вариант, который явился эффективным для реализации регенерационного потенциала пыльников риса — 2,4-Д в низких концентрациях (около 0,01 мг/л<sup>-1</sup>) в комбинации с 3 мг/л НУК и 3–4,5 мг/л КИН. Для увеличения образования каллусов и регенерации растений предложено делать добавки аспарагиновой и глютаминовой кислот, глютамина, триптофана и гидролизата казеина, мезо-инозита и картофельного экстракта. Их концентрации определяются эмпирически для конкретного набора генотипов [173]. Но есть мнения, что и без органических добавок на рисе можно добиться высокой результативности всех этапов, если сделать правильный выбор минеральной основы и регуляторов роста [171,174]. Так, Chaleff [204], используя такой подход, смог достичь 90 % регенерации зелёных растений у сортов подвида Japonica [205] и 47,5 % — выхода зелёных растений у сортов подвида Indica.

В культуре пыльников кукурузы лучшие варианты базировались на прописях сред — N6, либо YU-PEI [179], дополненных 10<sup>-4</sup> М Fe EDTA [64,175]. Оптимум концентрации сахарозы у одних из авторов был 9 %, у других — 12 % [27, 64, 176]. По сравнению с другими 8 углеводами, сахароза, а за ней рафиноза, оказали наиболее высокий эффект на образование эмбрионидных структур, но регенерация оставалась высокой только на среде с сахарозой [64]. Работа китайских исследователей [27] по изучению влияния 24 комбинаций средовых компонентов на процессы индукции и дифференциации растений лучшим выявила вариант N 6, где 2,4-Д (2мг/л<sup>-1</sup>) находился в сочетании с кинетином (1мг/л<sup>-1</sup>). После изучения 9 различных комбинаций [177] ростовых веществ на основе базовой среды YU-PEI [179] был предложен вариант, обеспечивающий высокий уровень индукции новообразований — с 3 мг/л 2,4-Д и 1,5 мг/л кинетина. Описан позитивный эффект 2,3,5-триодбензойной кислоты в индукционном процессе [178]. По влиянию на образование эмбрионидных структур выделялись варианты с добавлением 500 мг/л гидролизата казеина или при добавлении в индукционную среду 125 мг/л глютамина

+15 мг/л аспарагина при использовании вместо агара — желатина или агарозы. Регенерационная же среда отличалась уменьшенным содержанием сахарозы и добавлением в неё 1–2,5 мг/л кинетина либо 0,5–1,0 мг/л БАП [64].

Ячмень находится в числе злаков, у которых успешный результат по регенерации зелёных гаплоидных растений был получен в начале 70-х годов [9], когда уже досконально было проведено изучение путей морфогенеза микроспор [16, 19, 24], однако технология массового получения гаплоидов ячменя так и не разработана. В исследовании главных факторов — стадии развития микроспор, условий выращивания и предобработки доноров у ячменя заметен очевидный прогресс.

Но остался нерешённым основной вопрос для увеличения эффективности культуры пыльников ячменя — это преодоление на этапе регенерации сильного взаимодействия факторов «генотип и питательная среда».

Начиная с первых работ по ячменю, лучшие варианты среды подходили лишь для отдельных генотипов — это были сорта Sabarlis и Akka [9]. Из минеральных основ в прописях сред на тот период определены как наиболее подходящие — среды B5 и LS, но с уменьшенным в них уровнем нитрата аммония до 2 мМ. Регенерация была завершена получением 18 белых и 12 зелёных растений. Группа исследователей Foroughi-Wehr et al. [71] из 19 различных сортов ячменя, использовавшихся для получения зелёных растений из пыльников, выделила сорт Dissa, у которого было получено 8 % зелёных растений от посаженных пыльников, но при общем низком числе зелёных регенерантов в опыте.

Использование в экспериментах с ячменём низкотемпературного стресса, плавучести пыльников на кондиционированной жидкой среде с экстрактом картофеля, позволило Chuang et al. [181] значительно улучшить результаты по получению зелёных растений у сорта Sabarlis. В то время как с другими сортами эффект был невысоким или совсем не наблюдался. Попытки заменить кондиционирование среды добавлением глютамина и мезо-инозита не привели к созданию улучшенного варианта среды для многих генотипов ячменя [182] и не изменили эффективность процесса в лучшую сторону [183].

Вскоре Као [150] была предложена методика индукции каллуса из микроспор в культуре пыльников на жидкой среде с фикоаллом 400 трёх сортов и одного гибрида ячменя. В результате высокая часто-

та каллусной индукции была достигнута для всех образцов на низкосолевым варианте среды с добавлением 2,4-Д, зеатин-рибозид и 2,5 %-й сахарозы. Однако 30 %-ю способность к регенерации зелёных растений показал только один сорт Elrosa.

Поворотным моментом во взгляде на роль «средового» фактора в улучшении результативности метода культуры пыльников у ячменя явилось предложение Sorvari и Schieder [184] использовать новый тип среды EDAM — энзиматически легко усвояемую, свободную от агара и без сахарозы. Энергетический источник был получен из энзиматически обработанного ячменного крахмала. В результате этого нововведения удалось значительно улучшить процент регенерации эмбрионидных структур и увеличить отношение зелёных\альбинорастений, что было показано на 3 сортах, различающихся по отзывчивости. Эти же исследователи открыли «революционизирующую» роль мелибиозы, с помощью которой у первых двух сортов удалось значительно снизить выход альбиносных регенерантов: 1 зелёное растение \ 0,03–0,04 альбиносных.

Успешный результат продемонстрирован Finnie et al. [149] на ячмене. Им проведено замещение сахарозы альтернативными углеводными источниками: мальтозой, фруктозой, солодовым экстрактом, галактозой, смесью глюкозы и фруктозы, и в результате был выявлен новый путь улучшения отзывчивости генотипов. На вариантах, где вместо сахарозы присутствовала мальтоза (1–12 %), общий ответ пыльников значительно увеличивался, возрастал процент образования зелёных растений на вариантах с её концентрациями (6–12 %), генотипические различия наблюдались на всех вариантах. Тестирование генотипов выявило новый генетический источник высокой андрогенной способности — сорт Vlephheim (в среднем 3,5 зелёных растений на колос). Передача его высокой способности генетически доказана увеличением выхода зелёных растений у гибридов этого сорта, по сравнению с другими сортами, которые не отличались высокими показателями андрогенеза. Этим была наглядно представлена зависимость количества зелёных растений от концентрации мальтозы в среде и генотипа. В экспериментах по изучению регенерационной способности 27 генотипов ячменя из разных мест происхождения группа исследователей во главе с Рахимбаевым [30] после стандартизации условий холодовой предобработки и культивирования пыльников испытала их на «отзывчивость» (образование ими андрогенных структур). В качестве добавок к питательным средам в эксперимен-

тах автора были использованы: 1,5 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л кинетина, 2,0 мг/л глицина и 9 % сахарозы, 100 мг/л мезо-инозита — для N 6; 1 мг/л ИУК, 1 мг/л БАП и 6 % сахарозы — для MS; 0,25 мг/л 2,4-Д и 9 % сахарозы — для BLS. Из всей группы образцов были отобраны только 2 генотипа, показавших высокую отзывчивость на средах — на лучшей среде для всех испытанных генотипов — N 6 и на худшей среде — БЛЗ. Исходя из этого, авторы пришли к выводу, что у ячменя для каждой конкретной группы генотипов в культуре пыльников является неизбежным тестирование их по отношению к разным солевым основам сред и даже к отдельным компонентам.

В исследованиях Белинской [171] при постановке задачи по изучению генотипических возможностей разных форм ячменя с целью создания андрогенных гаплоидов возникла необходимость оптимизации питательных сред для достижения позитивного эффекта на всех этапах культивирования. Из 27 изученных вариантов наиболее подходящей явилась солевая основа среды N 6. Лучшим модифицированным вариантом для этапа индукции явился вариант — с добавлением к солевой основе 2 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л КИН, 20 % картофельного экстракта, крахмала (1 %), аланина, пролина, глутаминовой кислоты — каждого по 100 мг/л, 300 мг/л лактоальбумина, 6 % сахарозы, 1 % глюкозы. Установлено, что положительное влияние органических добавок проявлялось лишь на фоне оптимального для генотипов содержания сахарозы. Автор считает, что у ячменя генотипическая детерминация «ответа» на разных этапах андрогенеза может указывать на участие эпистатических генных эффектов в контроле отдельных этапов.

Проследив за развитием работ по культуре пыльников ячменя в направлении увеличения её результативности, нельзя не отметить достижение улучшения эффективности метода. Однако генотипически контрастное отношение (от 0-до максимума) к предлагаемым условиям культивирования пока преодолеть не удалось. Анализ литературных данных позволяет привести следующие цифры по уровню регенерации зелёных растений, полученных авторами на различных генотипах ячменя: в среднем — от 0,45 до 2 %, с максимумом — 24–49 % [30, 143, 184, 203]. По мнению исследователей, невысокий пока ещё выход зелёных регенерантов в среднем по генотипам и частое выявление неспособных к регенерации образцов ячменя, скорее всего, определяется несовершенством культуральной техники на этапе новобразования — регенерация [74, 180].

Для тритикале, синтетического амфиплоида, исследования на котором проводятся в генетическом и в селекционном аспектах не в столь значительных размерах, как на других видах злаков, работы по расширению возможностей метода культуры пыльников были также актуальны и потому проводились в разных странах. Было показано, что питательная среда играет значительную роль на всех этапах гаплопродукции тритикале, влияя на её результативность [33,123,133].

Исходя из разнообразия полученных разными авторами форм тритикале, для культивирования их пыльников были использованы разные среды. Представлены данные по введению в методические разработки следующих солевых основ питательных сред. N 6, B5, Као и Michayluk [187], LS, MS, Miller [188], 190–2 [190], P 2 [181], C 17 [191]. В качестве дедифференциатора чаще применяли 2,4-Д в концентрациях 0,5–10 мг/л, в зависимости от генотипа. Получен позитивный результат от использования для каллусной индукции 0,75–1 мг/л НУК, вместо 2,4-Д [189]. Уровень сахарозы в инициальной среде варьировался от 6 до 12 %, но чаще использовали 3 % [33,133]. В отдельных экспериментах для индукционных питательных сред исследователи использовали 9 %-ю мальтозу. Так, в комбинации первичной среды на базовой основе P 2 и C 17 с добавками 2 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л КИН, 9 % мальтозы, 6 г/л агарозы в индукционной среде и затем, после регенерации структур на среде 190–2, дополненной 0,5 мг/л НУК, 0,5 мг/л КИН и 100 мг/л глутамина, удалось значительно повысить регенерацию зелёных растений у отдельных генотипов из набора гибридных гексаплоидных F<sub>1</sub>-форм [192], у одних — на P 2, у других на среде C 17. Для усиления эффекта взаимодействия «генотип × среда», на которое указывалось ещё в ранних работах с тритикале [33,193], исследователи вынуждены были делать новые модификации сред для создания наиболее подходящих для разных групп генотипов базовых основ, варьируя органическими и гормональными добавками, углеводными источниками и гелеобразующими компонентами. В работе Лукьянюк [33] индукция микроспор у различных генотипов проходила активнее (до 20 %) на модифицированном варианте среды Г-В5, где присутствовали 2 мг/л 2,4-Д, глутамин 100 мг/л или оксипролин 100 мг/л. На лучшем варианте среды Г-В5 выход зелёных растений у октоплоидного тритикале составил 31,8 % (от высаженных пыльников).

Gonzales и Jouve [194] на четырёх вариантах индукционной среды и пяти вариантах среды, использованной для регенерации растений тритикале, отметили, что взаимодействие генотипа и среды проявля-

лось сильнее на этапе индукции, чем на этапе регенерации. Этот факт позволил сделать вывод, что отсутствие генотипической селекции на этапе регенерации имеет большое значение для проведения работы на гибридах тритикале, так как при этом отсутствует ограничение для использования в работе расщепляющегося материала. В разработанных условиях авторы гарантировали уровень регенерации зелёных растений тритикале 2,42–15,36 %, в зависимости от генотипа.

Для исследователей, занимающихся вопросами гаплоидии пшеницы посредством культуры пыльников, средовой фактор является одним из главных. В каждой работе обязательно рассматривалось влияние его на процесс андрогенеза в зависимости от генотипа. Различные солевые основы разных прописей были испытаны на роль наиболее подходящих для культивирования пыльников пшеницы — MS, Miller, N6, RMR 64 [195], B5, P1 [196], P2. Использовались жидкие среды и твёрдые — на агаре [197]. Важным для работы по андрогенезу пшеницы, как и риса, оказалось содержание в индукционных средах сульфата аммония и нитрата калия, поэтому базовая основа среды N6 оказалась подходящей и для пшеницы. Однако при включении в работу генетически разнообразного материала далеко не все генотипы реализовывали на ней эмбриогенный потенциал [47, 84]. После снижения содержания нитрата калия и сульфата аммония, дополнительного введения нитрата кальция и хлористого калия, а также удаления некоторых микроэлементов и витаминов и введения 10 % картофельного экстракта, 0,5–1 г/л глутамина и 9 % сахарозы на базе среды N6 был создан вариант — P-2 [181], получивший широкое распространение на пшенице. В поисках лучшего варианта модификации питательной среды внимание было уделено подбору источника углеводов. Оптимум содержания сахарозы для большинства генотипов на индукционных средах составил 9 %, в то время как для регенерации достаточно было — 2 % [197]. Для улучшения результативности андрогенеза в культуре пыльников использовали мальтозу и глюкозу вместо сахарозы, но только у отдельных генотипов, на них удалось получить высокий результат [201]. В дальнейшем были испытаны разные органические добавки, например, мезоинозит и некоторые аминокислоты [57]. Влияние их было позитивным и не снижало результативности работы, и потому они использовались в отдельных авторских модификациях [47].

Определению дедифференциатора для пыльников пшеницы также было уделено внимание. Были высказаны различные мнения: ис-

пользовать низкий уровень 2,4-Д — 0,15–2 мг/л [46], совсем не добавлять [34], использовать в сочетании с кинетином (КИН) — 2 мг/л, 2,4-Д + 0,5 мг/л КИН [198], использовать высокие концентрации 2,4-Д [59]. Последнее предложение, по мнению автора, могло быть применено в работе с малоотзывчивыми генотипами, поскольку высокая концентрация 2,4-Д может оказать сильное влияние на так называемый «рецептор клеточной стенки пыльника» и включить индукционную стадию в пыльниках хотя бы у пристеночных микроспор. Имеются данные о положительном эффекте НУК 0,75–1,0 мг/л на индукцию растений из пыльников пшеницы непосредственно на первичной среде [199].

В последние годы для культивирования пыльников пшеницы стали включать среду 190–2 [190] и различные её модификации [200] с новыми гель-образующими компонентами — с гелритом и фитогелем. В практической работе по получению гаплоидов у большого числа генотипов пшеницы каждый исследователь, как правило, использует несколько вариантов питательной среды. Из собственного опыта каждый экспериментатор знает, что меняя состав среды для культуры пыльников, можно дифференцировать отдельные генотипы по результативности этапов андрогенеза. И затем проводить сравнение их отзывчивости в других условиях, чтобы добиться позитивного влияния на процесс гаплопродукции.

Поскольку все факторы этого процесса находятся во взаимодействии, исследователи не прекращают изучение их взаимозависимости и влияния на конечный результат работы. Так, Васильевым [202] с помощью дисперсионного анализа показано, что состав индукционной среды оказывает наибольшее влияние на проявление компетентности микроспор у яровой мягкой пшеницы. Выявлена тесная связь «генотип × состав среды» по признаку «образование эмбриогенных структур», что, по мнению автора, указывает на возможность изменения нормы реакции генотипа на этом этапе. Другим автором [203] при изучении взаимодействия между факторами «генотип × среда × индукция эмбриоидов × регенерация» в культуре пыльников яровой и озимой мягкой пшеницы с помощью методов дисперсионного и корреляционного анализа показано, что только сочетанием регуляторов роста и базовой среды можно добиться увеличения выхода регенерантов. На пшенице с введением вариантов питательных сред на основе N6, P-1, P-2 оказалось возможным увеличить результаты по выходу гаплоидов в среднем на 10 % и выше,

в зависимости от набора генотипов и числа культивируемых пыльников [59, 202].

Самые высокие результаты по регенерации зелёных растений из пыльников у отдельных генотипов пшеницы, достигнутые несколькими авторами, приведенные в работах Ну [48, 59], а именно — 117 зелёных растений\100 пыльников (Li, 1989), 360 зелёных растений\100 пыльников (Chu et al., 1990), 322 зелёных растений\100 пыльников (Kasha et al., 1990), 200–455 зелёных растений\100 пыльников (Orshinsky et al., 1990), производят впечатление на любого исследователя, занимающегося изучением вопросов эффективности культуры пыльников у злаков. И вызывают уверенность в возможном достижении такого уровня реализации эффективности метода и на других культурах. Китайские учёные считают, что по мере роста технических возможностей и использования новых химических материалов частота эмбриогенеза микроспор у злаков, хоть с большими трудностями, но возрастает. И вполне реально ожидать результата, когда из одного пыльника можно будет получать более чем одно зелёное растение [59].

#### *1.1.1. Недостатки и проблемы, проявляющиеся при прохождении гаплопродукционного процесса в культуре пыльников злаков, — факторы снижения эффективности метода; причины их появления и возможности преодоления*

Настоящий обзор был бы необъективным, если бы в нём не нашли отражение недостатки и проблемы метода культивирования пыльников, из-за которых ещё во многом сдерживается его использование в селекции и генетике. Это, как правило, выявляющаяся среди регенерантов хлорофиллдефектность и гаметоклональная изменчивость по пloidности и другим жизненно-важным признакам. «Некомплектные» регенеранты зачастую понижают выход растений, и это особенно ощутимо, когда работа проводится на генетически ценном материале.

Регенерация альбиносных растений является отрицательным феноменом культуры пыльников у всех видов злаков. У риса, как показано разными авторами, частота их возникновения колеблется в зависимости от генотипа от 10 % до 100 % [145, 206]. Высоким был их уровень у межвидовых гибридов от скрещивания сортов двух подвидов Japonica и Indica. Такого же порядка данные у ячменя [30, 143], а

у тритикале — от 8 % до 100 % [21, 33, 122]. Авторы, работающие с кукурузой, отмечали появление альбиносных растений в большом количестве у отдельных генотипов, как и у вышеупомянутых злаков. Но они не считали, что этот недостаток важен для кукурузы [64, 175].

В любой работе по культуре пыльников пшеницы получаемое различное количество растений с дефектами по содержанию хлорофилла сопутствует зелёным регенерантам [55, 84, 207]. Авторы уже высказывали мнение о зависимости появления такого типа аномальных регенерантов от генотипа [80]. Они даже выдвигали в защиту этого тезиса, что если в гибридной комбинации  $F_1$  один из партнёров проявлял тенденцию к альбинизму, то в гибридном потомстве обязательно появлялись хлорофиллдефектные регенеранты в большем количестве. Важным было то, что пыльники гибридных растений проявляли способность к регенерации в большей степени, чем пыльники растений сорта. Есть исследователи [119], настаивающие на роли поздней фазы микроспоры пыльников в регенерации альбиносных растений [30].

Большинство же авторов работ, рассматривая возможные причины увеличения уровня таких регенерантов при культивировании пыльников, первыми называют физиологические факторы. Именно — предобработки донорного материала, питательные среды для регенерации (влияние углеводного компонента, марки агара, соотношения различных микроэлементов, образование комплексов ингибиторов при автоклавировании), высокие температуры при культивировании пыльников — всё это может оказывать влияние на развитие хлоропластов и синтез хлорофилла. Однако истинная природа этого явления ещё не раскрыта. Констатируя факты появления альбиносных растений, экспериментаторы постоянно ищут пути снижения их количества [123, 207], манипулируя температурой и освещённостью на этапе регенерации. Потому изучение сути вопроса альбинизма отодвигается на второй план. Высказывалось предположение о возможных дефектах фотосинтетического аппарата на уровне ядерного генома донорного растения [80]. Существует мнение о возможном происхождении альбиносов из генеративной клетки, в которой отсутствуют пластиды [119]. Высказаны мнения о том, что альбинизм определяется отсутствием отдельных фрагментов на рибосомальной РНК у хлорофиллдефектных регенерантов [23] и/или делециями на их хлоропластной ДНК [208]. И что в проявлении феномена альбинизма наряду с генетическими проявляются эффекты, производимые

условиями выращивания растений-доноров и условиями культивирования пыльников *in vitro* [209]. Многие исследователи считают [35, 64, 78, 123, 207], что необходимо продолжение поисков оптимальных условий культивирования, которые могут позитивно изменить соотношения — зелёные\альбиносные растения.

Другая проблема, возникающая в процессе работы, — вариабельность получаемых регенерантов по числу хромосом — также не остаётся без внимания исследователей, поскольку по плоидности зелёных регенерантов судят об эффективности избранных условий работы. Самым главным критерием метода является выход полноценных гаплоидных и спонтанно удвоенных диплоидных растений. Изучение регенерантов различных видов злаков даёт возможность выявить растения с вариацией числа их хромосом — от анеугаплоидов до миксо- и полиплоидов. Причём доля регенерантов с каждым уровнем плоидности (от общего количества регенерантов) неодинакова у разных видов.

У риса получаемые новообразования представлены в основном каллусами, в которых плоидность клеток значительно колебалась (от  $1x$  до  $5x$ ). Этим объясняли появление негаплоидных регенерантов даже от каллусов, произошедших из одной микроспоры [210]. В работе приведен пример изучения 46 каллусов из пыльников, среди которых были такие, которые через 20 дней культивирования на среде с 2,4-Д на 24 % состояли из негаплоидных клеток. Каллусы, прошедшие 19 пассажей, состояли только из тетраплоидных и гексаплоидных клеток. В нескольких каллусах отмечено экспоненциальное увеличение уровня плоидности —  $n$ ,  $2n$ ,  $4n$ ,  $8n$ . Преимущественной причиной этого, по мнению авторов, является эндомитоз. В работе китайских исследователей [35] описан случай, когда после 34 пассажей субкультивирования каллусный клон риса был на 89 % диплоидным, и только незначительное число клеток в нём было на гаплоидном и полиплоидном уровне. Высокий процент диплоидных регенерантов из каллусов в культуре пыльников риса — частое явление. Оно является результатом спонтанной диплоидизации гаплоидов и играет важную роль в продукции гомозиготных растений за короткий период.

Регенерантам кукурузы также свойственна вариабельность по числу хромосом. Приведены данные [211], в которых среди полученных регенерантов были — 2 гаплоида, 6 спонтанных диплоидов, несколько миксоплоидных растений — с гаплоидным и диплоидным числом клеток. По литературным данным — у кукурузы частота по-

явления спонтанно удвоенных в условиях *in vitro* гаплоидов, по мнению исследователей, довольно низка и в максимуме приближается к 10 % [64]. Среди зелёных регенерантов после спонтанного удвоения зачастую обнаруживаются фертильные «полисоматические химеры» с диплоидными секторами в метёлках и початках. Автор считает, что это определяется компетенцией генотипа-донора.

Изменчивость по числу хромосом у регенерантов ячменя, по разным данным, менее вариабельна и не представляется негативной при общей оценке результативности метода, как это имеет место у других злаков [78]. В работе Devaux [212] из 147 растений из пыльников, полученных от 8 гибридов ячменя, было выделено 63 % спонтанных дигаплоидов и 27,9 % гаплоидов, остальные 6,8 % — составляли тетраплоиды, триплоид и два анеуплоида. Близкий к этому результату по уровню плоидности у ячменя был получен и другими исследователями [48, 30]. Считают, что причинами спонтанной диплоидизации может быть эндоредупликация и эндомитозы [136, 213]. По данным Белинской [143], спонтанные дигаплоиды среди полученных регенерантов составляли 80,5 %, а 12,8 % — были гаплоидами, и всего несколько растений были представлены миксоплоидами, анеуплоидами и тетраплоидами. В работе Ziauddin et al. [214] 80 % регенерантов были фертильными спонтанными диплоидами, а остальная часть была представлена гаплоидами, тетраплоидами и несколькими анеуплоидами. Тивари [38] высказал мнение, что морфогенные структуры из пыльников ячменя выходят на регенерацию скорее, если в большей степени состоят из диплоидных клеток. Это является важным моментом при разработке условий целенаправленного получения спонтанно удвоенных гаплоидов.

Среди растений, регенерированных из пыльников тритикале, напротив, всегда наблюдалась широкая вариация по плоидности, как среди зелёных, так и среди хлорофиллдефектных растений [33, 80, 81, 122, 123]. Интересно в этом аспекте отметить и более широкую изменчивость по количеству хромосом у регенерантов тритикале — увеличенное, по сравнению с другими видами, число анеу- и гиперплоидных форм, и наоборот — низкое число спонтанно удвоенных гаплоидов и химер по плоидности [215]. Для объяснения этих фактов, характерных для тритикале и для других отдалённых гибридов на основе пшеницы, выдвинуто предположение, что их проявление может являться следствием высокой гетерозиготности и нестабильности использованных в работе растений-доноров пыльников [33, 80].

После получения первых результатов на мягкой пшенице [22] было объявлено, что все регенеранты были гаплоидами. Позднее, изучив мейоз у образованных из микроспор растений, Hu et al. [49] показали наличие у них различных уровней плоидности. Среди них, кроме гаплоидов и спонтанных диплоидов, 10 % регенерантов были гетероплоидами или анеуплоидами. Результат с различной плоидностью полученных зелёных регенерантов пшеницы представлен и в работах французских исследователей [84]. В качестве механизмов, объясняющих появление спонтанно удвоенных гаплоидов у пшеницы, наиболее вероятными представляются эндомитоз [218] и эндоредупликация [219].

Гомозиготность полученных спонтанно удвоенных гаплоидов, по мнению различных авторов, позволяет использовать их в селекционных программах. По другим результатам [199], 95 % полученных растений имели гаплоидный уровень хромосом, и только остальная часть находилась на иных уровнях плоидности. Работая с инбредным сортом пшеницы Centurk, группа Kudirka et al. [54] получила растения из 10 каллусов, которые были различными по плоидности — полигаплоиды, гексаплоиды, миксоплоиды и анеуплоиды. Описан случай, когда полученное растение из пыльников пшеницы в корневой меристеме содержало 84 хромосомы [216]. Отмечена регенерация из пыльников анеуплоидов — нулли-2А ( $2n=40$ ) [57] у сорта C. spring [57]. Замечено [217], что у пшеницы гомеологичные хромосомы трёх её геномов могут компенсировать каждую, недостающую из них, при регенерации каллусных культур *in vitro*. Выявлены факты появления тетрасомика и трисомика по 6В хромосоме и телоцентрика по 1В хромосоме [49]. Хотя это является нежелательным явлением для практической работы, но представляет интерес для хромосомной инженерии. И потому для оценки генетического статуса регенерантов необходимо проводить исследование мейоза, особенно для выявления случаев экстремально-дозы гомеологичных хромосом и определения их влияния на различные признаки. Так как предполагается, что различные типы вариабельности могут быть вызваны структурными изменениями в хромосомах или замещениями одних хромосом другими [54]. И это может соответствовать мутациям [220]. Однако отдельные исследователи считают, что для мягкой пшеницы можно отработать условия культивирования для получения регенерантов, способствующие приемлемому для практической работы уровню выхода спонтанно удвоенных гаплоидов [47, 82, 219].

Для рассматриваемых видов изменчивость, выявляемая у гаплоидов и у растений, полученных в культуре пыльников после удвоения их числа хромосом, по различным морфологическим, биохимическим и физиологическим признакам, объединяется под названием гамето-клональной. И, как показано во многих случаях, после её выявления в последующих поколениях она была стабильной по позитивным для селекции признакам [49, 117, 219]. У растений злаков отмечают изменения по таким биологическим признакам: сроку колошения, высоте, способности к кущению, по форме и длине колосьев, метёлок и величине остей, весу 1000 зёрен, продуктивности [33, 35, 219], устойчивости к болезням [200], а из биохимических признаков отмечают изменение в спектре глиадина [219]. Выявляемое разнообразие, по мнению исследователей, может быть основой для отбора генотипов, которые при наличии стабильности их генома могут быть полезными в качестве исходного материала для селекции [117, 219, 200].

Таким образом, представленный анализ развития метода культуры пыльников и оценка разными авторами эффективности его использования в работе с важными в хозяйственном отношении злаками позволили осветить их данные по созданию оптимальных условий для прохождения этапов гаплопродукционного процесса — индукции спорофитного пути развития микроспор в системе *in vitro*, образования морфогенных структур и их регенерации в растения. Это даёт уверенность утверждать, что метод культивирования пыльников в виде отдельных вариантов биотехнологий для разных видов имеет реальную перспективу для использования в селекции при создании линейных сортов злаков [443]. Имеющиеся успехи, представленные в этом направлении, значительны. Так, более 42 сортов риса создано в Корее, более 100 сортов риса находятся в производстве в Китае [47,117]. Из них важным событием считают создание линейного сорта гибридного риса [222]. Сорт риса получен в Болгарии [230], 2 сорта озимой мягкой пшеницы созданы во Франции [225] и в Венгрии [221], 2 сорта яровой мягкой пшеницы зарегистрированы — в России [506] и в Канаде [503]. Создан сорт ячменя в Дании и один сорт — во Франции, два сорта ячменя получены в Германии и один — в Австралии [224].

Однако анализ экспериментальных данных, полученных исследователями разных стран за последние 25 лет по изучению лимитирующих факторов гаплопродукции и поиску путей повышения её эффективности в культуре пыльников злаков, был бы незавершённым без рассмотрения полученных нами результатов в разных аспектах этой темы.

Так, при использовании метода культуры пыльников на генотипах мягкой пшеницы и тритикале, представляющих интерес для селекции, нами показано решение теоретически и практически важных для селекции биотехнологических задач. В результате — в сроки значительно короче, чем в традиционной селекции, был создан ценный исходный материал, который передан для селекционного изучения и оценки.

Кроме этого в данной работе представлены наши научные разработки по созданию модификаций других биотехнологий, направленных на использование в селекционном процессе. Таких как — получение гаплоидов на основе гаплопродюсера, получение новых форм из отдалённых гибридов злаков через эмбриокультуру, а также представление новых подходов к разработке методик по разным направлениям селекции *in vitro*.

## 1.2. ИЗУЧЕНИЕ ГАПЛОПРОДУКЦИОННОГО ПРОЦЕССА В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ *IN VITRO* ТРИТИКАЛЕ, ПШЕНИЦЫ И ГИБРИДОВ С ИХ УЧАСТИЕМ — С ЦЕЛЬЮ РАЗРАБОТКИ БИОТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ ГОМОЗИГОТНЫХ ЛИНИЙ ИЗ ЭТОГО МАТЕРИАЛА В УСЛОВИЯХ ЮГА УКРАИНЫ

### 1.2.1. Влияние различных факторов на этапы гаплопродукционного процесса у разных генотипов пшеницы и тритикале

После изучения результатов, представленных в мировой литературе по культуре пыльников пшеницы и тритикале, и обратив внимание на проблемы и недостатки метода, мы пришли к выводу, что его эффективность ещё не достаточна для внедрения в селекционную работу с данными культурами на юге Украины. В этой связи необходимо было определить возможности для достижения позитивного влияния на главный показатель процесса — выход гомозиготных линий из гаплоидов, полученных из разного генетического материала указанных культур. Процесс гаплопродукции в культуре пыльников, схематически представленный на рисунке 1.2, отражает последовательность этапов работы, определяющих её результативность при проведении на тритикале и пшенице. Так, является установленным фактом, что стадия микроспор — первый критический фактор в индукции гаплопродукционного процесса в культуре пыльников злаков. Поэтому её определение проводили на микроспорах пыльников в колосьях на

момент срезки донорных побегов, затем — в конце периода предобработок, у подготовленного к высадке материала для выявления оптимума условий для инициации разных морфогенетических путей развития микроспор по спорофитной программе. В итоге необходимо было представить оценку гаплопродукционной способности разного генетического материала тритикале, полученного на основе далее приведенной схемы.

Для тритикале и пшеницы необходимо отметить характерное проявление повышенной отзывчивости к развитию морфогенных процессов микроспор в пыльниках в первом колосе, появляющемся на растении. Для отработки технологических условий и эффективного проведения индукционного этапа был поставлен эксперимент по выявлению в материале пыльников этих культур оптимальной фазы развития микроспор (табл. 1.1).

Таблица 1.1

Влияние уровня развития микроспор в пыльниках тритикале и пшеницы на частоту формирования новообразований на индукционной среде Г Б-5

Фаза развития микроспор	Количество высаженных пыльников		Процент пыльников с новообразованиями	
	Тритикале Чехословакия 77	Пшеница Обрий	Тритикале Чехословакия 77	Пшеница Обрий
Ранняя однояд.	730	690	0,37 ± 0,06	0,41 ± 0,39
Средняя однояд.	620	710	2,14 ± 0,08*	2,45 ± 0,32*
Поздняя однояд.	780	840	2,74 ± 0,108*	3,20 ± 0,14*
Двухядерная стадия	765	710	0,47 ± 0,84	0,32 ± 0,06

Достоверно при P = 0,05.

Из данных таблицы следует, что у обеих изучавшихся культур оптимальными для индукции андрогенеза являлись пыльники, в которых период развития микроспор в большей их части находился в интервале между средней (слабовакуолизированной) одноядерной и двухядерной стадиями развития. Чтобы микроспоры в колосе находились преимущественно в заданном интервале развития, с нижней и верхней частей колосьев подготовленных к работе растений пшеницы удаляли крайние цветки.

Фактором, определяющим проявление морфогенетических событий в процессе культивирования пыльников, характеризующихся количественными и качественными параметрами процессов (скорость появления микроструктур, их частота и тип, а затем и визуально

### СХЕМА ПОЛУЧЕНИЯ ГАПЛОИДОВ ТРИТИКАЛЕ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ПЫЛЬНИКОВ

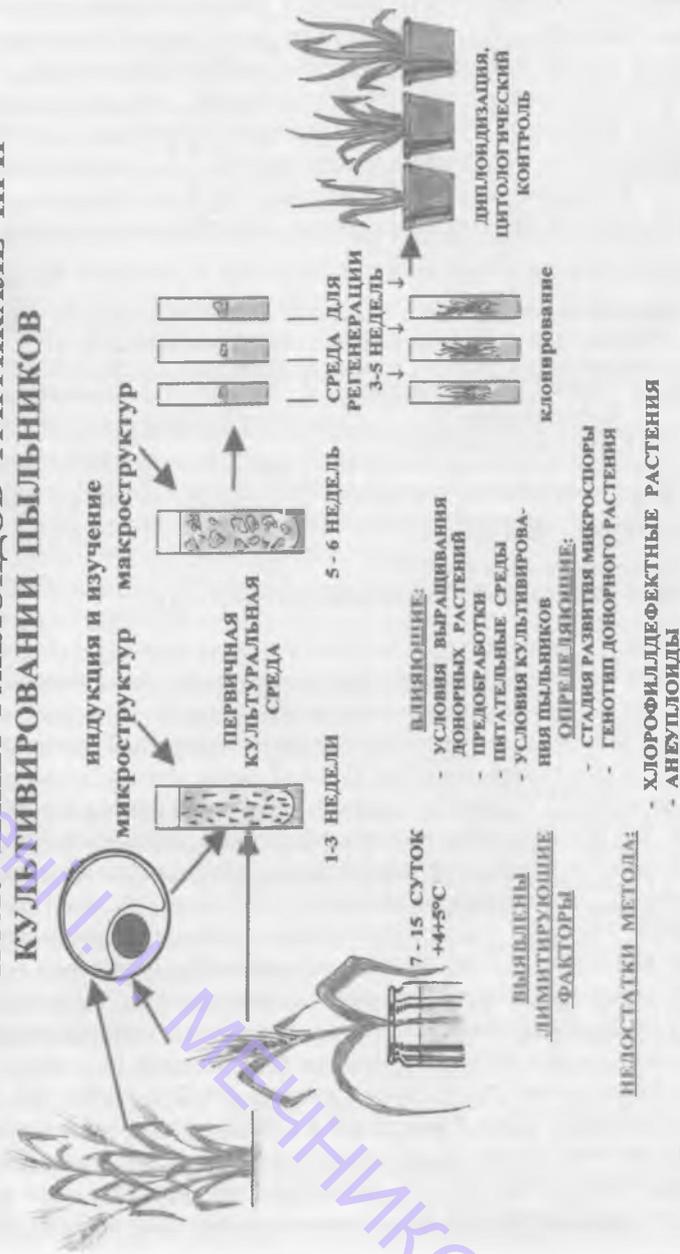


Рис. 1.2

различимые новообразования), является индукционная питательная среда. Для пыльников тритикале лучшей нами была определена среда ГБ-5. На её основе проводили изучение влияния различных компонентов среды на показатели морфогенетического процесса в культуре пыльников. Выявлено, что для формирования структур в пыльниках тритикале являлось необходимым присутствие 2,4-Д в концентрации 1,5–2 мг/л, в то время как НУК, кинетин и ИУК не оказывали существенного влияния на процесс индукции новообразований (табл. 1.2).

Таблица 1.2

**Формирование новообразований в пыльниках тритикале на примере генотипа 9АД 20\1 на различных вариантах первичной среды ГБ-5**

Базовая основа ГБ 5 + варианты фитогормонов	Высажено пыльников	Процент новообразований
1,0 мг/л ИУК + 0,1 мг/л кинетин + 2 мг/л 2,4-Д	750	2,2 ± 0,348
2 мг/л 2,4-Д	730	5,8 ± 0,594
1,0 мг/л НУК + 0,1 мг/л кинетин	680	0,6 ± 0,152

НСР 1,134 достоверно при  $P = 0,05$ .

F расч. между вариантами 59,743, достоверно при  $P = 0,01$ .

На озимых и яровых генотипах пшеницы, тритикале и их гибридных формах был изучен интервал температурной предобработки от 0 до 10 °С срезанных побегов с колосьями, в темноте. Установлено, что для пшеницы наиболее благоприятны такие параметры предобработки побегов с колосьями: при 2–4 °С и 4–7 суток содержания в воде, а для тритикале: 3–5 °С, при 7–12 сутках — в водном растворе с 100 мг/л пролина. Для обеих культур весьма эффективно, дополнительно к холодной предобработке, в первые сутки культивирования пыльников на первичной среде использовать ещё и 3-суточный тепловой шок при температуре 30–32 °С. На тритикале было проведено сравнительное изучение влияния 2,4-Д-кислоты и её калиевой и натриевой солей в качестве первичных индукторов дедифференцировки. Эффективной по влиянию на общее количество сформированных новообразований, которые были представлены в основном каллусами (и только 10 % были эмбриоидными структурами), явилась 2,4-Д-кислота. Обе соли, снижая количество новообразований в целом, положительно и существенно влияли на образование эмбриоидных структур. Калиевая соль оказывала позитивный эффект на последующую регенерацию растений и улучшала соотношение регенерантов в пользу зелёных. К вы-

бору типа и уровня 2,4-Д подходили избирательно, исходя из разного влияния данного фактора на индукцию морфогенеза.

С целью стимулирования деления ядер микроспор в индукционном периоде в пыльниках была изучена роль аминокислот в метаболизме пыльников тритикале при предобработке и культивировании, а затем определено и их влияние на последующие этапы морфогенеза при добавлении в питательные среды. В результате было выявлено, что экзогенный глютамин оказывал преимущественное влияние на появление каллусов, а пролин и оксипролин — на эмбриоидогенез. Количество регенерантов у обоих генотипов было выше на средах с присутствием пролина и оксипролина. Весьма вероятно, что эти аминокислоты могут принимать активное участие в синтетических процессах образования различных белковых комплексов и ферментов, играющих важную роль в построении клеточных стенок многоклеточных структур, а возможно — и в реализации генотипом важных морфорегуляторных функций. Вероятно, не следует исключать их возможное участие и в процессах деления компетентных микроспор в инициальной фазе дедифференцировки.

В дополнение к экспериментам с аминокислотами, были изучены эффекты от добавления в индукционную среду некоторых органических кислот, которые важны для растительного организма в качестве предшественников в циклах синтеза аминокислот.

С учётом полученных данных [442, 444, 491], нами разработана модификация первичной питательной среды, которая была использована для индукции новообразований в пыльниках тритикале. Этот вариант среды представлен следующим составом: минеральная часть и витамины — согласно прописи ГБ-5, 2,4-Д (или её соли) — 2 мг/л, глютамина — 100 мг/л и оксипролина — 115 мг/л, сахарозы — 30 г/л, мезо-инозита — 100 мг/л, органических кислот (яблочная, альфа-кетоглутаровая, натриевая соль пировиноградной кислоты) — от 25 мг/л и выше, агара — 0,6 %.

Из полученных результатов следует, что эта группа веществ заслуживает внимания в плане использования их в качестве добавочных компонентов к питательным средам для разных представителей семейства злаков. Польза их присутствия для данной биотехнологической гаплопродукционной системы была явной, и проявилось это на всех этапах морфогенеза микроспор в пыльниках тритикале. Однако вполне вероятно, что генотипический фактор любого другого донорного материала может внести поправки в требуемые концентрации каждого

из использованных веществ. Возможны их индивидуальные эффекты на такой важный показатель процесса, как уровень образования зелёных растений. Однако выбор из органических кислот, лучших по влиянию на главные показатели процесса, может помочь исследователям предоставить наиболее эффективный вариант питательной среды для работы по андрогенной гаплоидии разных видов злаков.

Для регенерации растений из образовавшихся структур в культуре пыльников тритикале нами был разработан оптимальный вариант питательной среды — с полной минеральной основой среды ГБ-5, ИУК 1 мг/л, кинетин 1 мг/л, мезо-инозит 100 мг/л, 1/2 концентрации витаминов по Staba, 0,1 мг/л витамина Е (альфа-токоферол) и 25 мг/л яблочной кислоты. Этот вариант питательной среды под названием Р-8 был использован нами в дальнейшем для работы и с генотипами пшеницы.

В основном же для пшеницы были использованы обогащённые среды — N6 и Potato-2 (с добавлением экстракта картофеля, либо вместо него — 10 г/л растворимого картофельного или пшеничного крахмала), с добавлением 0,5–1 мг/л гибберелловой и 25 мг/л яблочной кислоты, 200 мг/л пролина, 200 мг/л глутамина. Для отдельных генотипов тритикале предпочтительней разных ранее использованных вариантов являлась питательная среда N6, обогащённая добавками крахмала, глутамина, пролина и яблочной кислоты в рекомендуемых нами концентрациях.

Уровень морфогенетического «ответа» изучаемых генотипов злаков в культуре пыльников часто является непредсказуемым из-за неизвестной реакции на предлагаемые условия *in vitro* у использованной в работе формы и, в частности, на конкретную питательную среду. Было установлено, что показатели этого «ответа» можно корректировать, проводя предварительное тестирование эффективности первых этапов морфогенеза у исследуемых генотипов пшеницы и тритикале в культуре пыльников на нескольких вариантах рекомендованных нами базовых сред, при варьировании условий культивирования для выбора наиболее оптимальных и эффективных для работы [259]. Такой подход оправдывал себя при работе с «низкоотзывчивыми» образцами и, по нашему мнению, должен быть обязательным элементом биотехнологической системы при включении в работу *in vitro* нового селекционного материала изучаемого вида злака [241, 700]. Следуя принципу систематики путей морфогенеза, предложенной Sunderland и Dunwell [24], Reinert, Bajaj [233], нами были отмечены некоторые особенности морфогенеза у обеих культур в пыльниках. Очевидными были пути — А, В, С, характерные для процесса андрогенеза разных

злаков. У тритикале их можно было наблюдать при культивировании пыльников, вплоть до 12-го дня. То есть у этой культуры появление всех путей было пролонгировано во время прохождения индукционного периода. У пшеницы преимущественно проходившим в более короткий срок был В-путь — с равным симметричным делением ядра после первого митоза и образованием двух ядер, типа вегетативного, с последующим образованием из каждого ядра многоядерных микроспор. Реже отмечали А-путь — с неравным делением ядра микроспоры в первом митозе на генеративное и вегетативное, с последующим делением только вегетативного ядра и образованием многоклеточных спор. С-путь — с независимым делением вегетативного и генеративного ядер — наблюдался сравнительно чаще у тритикале, чем у пшеницы. Как следствие этого — многоядерные микроспоры (рис. 1.3)

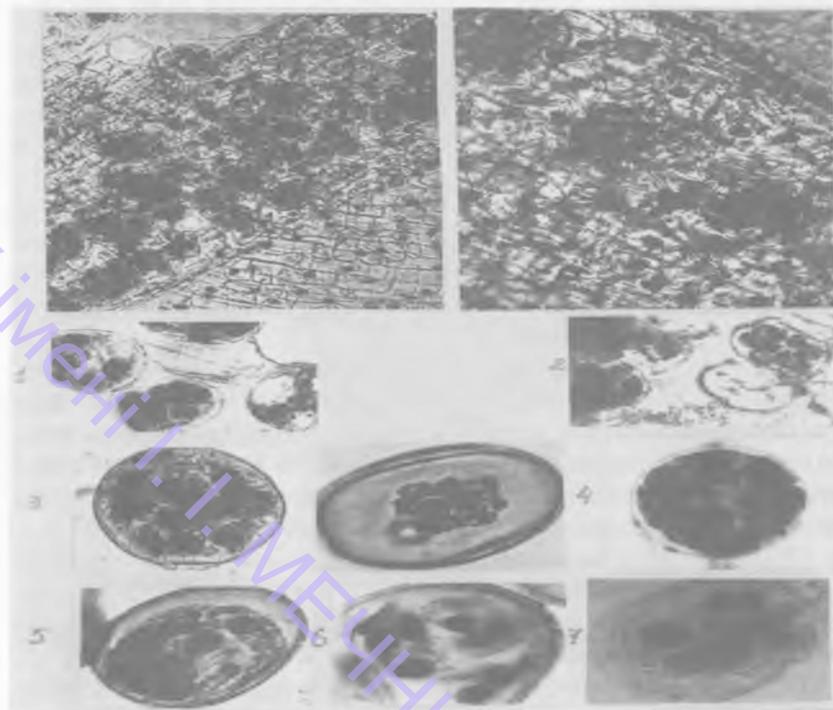


Рис. 1.3. Многоядерные структуры в микроспорах изолированных пыльников тритикале и пшеницы (наверху общий вид частей пыльника — увеличение 100–200; фрагменты: 1, 2 — 400; 3–7 — 1000)

наблюдались уже в ранние сроки культивирования, чаще всего — в первые 10–12 дней после высадки пыльников на питательные среды, как у пшеницы, так и у тритикале.

В этот период времени как у пшеницы, так и у тритикале, можно было наблюдать в микроспорах пыльников появление клеток, в которых чётко просматривались равные по величине ядра, но неодинаковые по плотности окраски, явно генеративные и вегетативные. Отмечено появление клеток с происходящими в них одновременно независимыми делениями, а также со слившимися ядрами после повторного митотического деления, чаще всего — генеративного ядра. У пшеницы преимущественно проходившими в короткий срок оказывались В-путь с равным симметричным делением ядра и А — путь с неравным делением ядра в первом митозе на генеративное и вегетативное. С-путь с независимым делением вегетативного и генеративного ядер наблюдался чаще у тритикале.

Многоклеточные микроспоры (Рис. 1.4) у обеих культур в возрастающем количестве наблюдались после двухнедельного периода от начала культивирования пыльников в условиях *in vitro* и они отличались многообразием вида и величиной клеток — мелкоклеточные и крупноклеточные. Иногда они встречались с низкой частотой (0,03–0,09 %) после недельного срока культивирования, и только в пыльниках тритикале можно было заметить появление образований вне и внутри оболочки клеток, которые внешне напоминали 4–7-дневный зародыш, развивающийся в условиях *in vivo* у злаков при оплодотворении (рис. 1.4 — нижний ряд).

По нашему мнению, такое быстрое образование эмбриоидов возможно, когда они возникают из многоядерных образований типа пыльцево-зародышевых мешков, которые нами были отмечены только в пыльниках тритикале с частотой 0,03–0,248 % на вариантах сред с добавками глутамина и оксипролина. Этот феномен описан другими авторами, наблюдавшими его в культуре пыльников ячменя [474].

Иногда после нескольких митотических делений ядер в споре образовывались клетки больших размеров с толстыми оболочками, после разрыва которых клетки распадались, и затем из каждой из них могли возникнуть новые крупноклеточные ассоциации.

В пыльниках пшеницы среди многоклеточных структур встречались клетки с одним находившимся в процессе формирования или уже с сформированным эмбриоидом, а иногда — даже с несколькими. Многоклеточные структуры в изолированных пыльниках тритикале

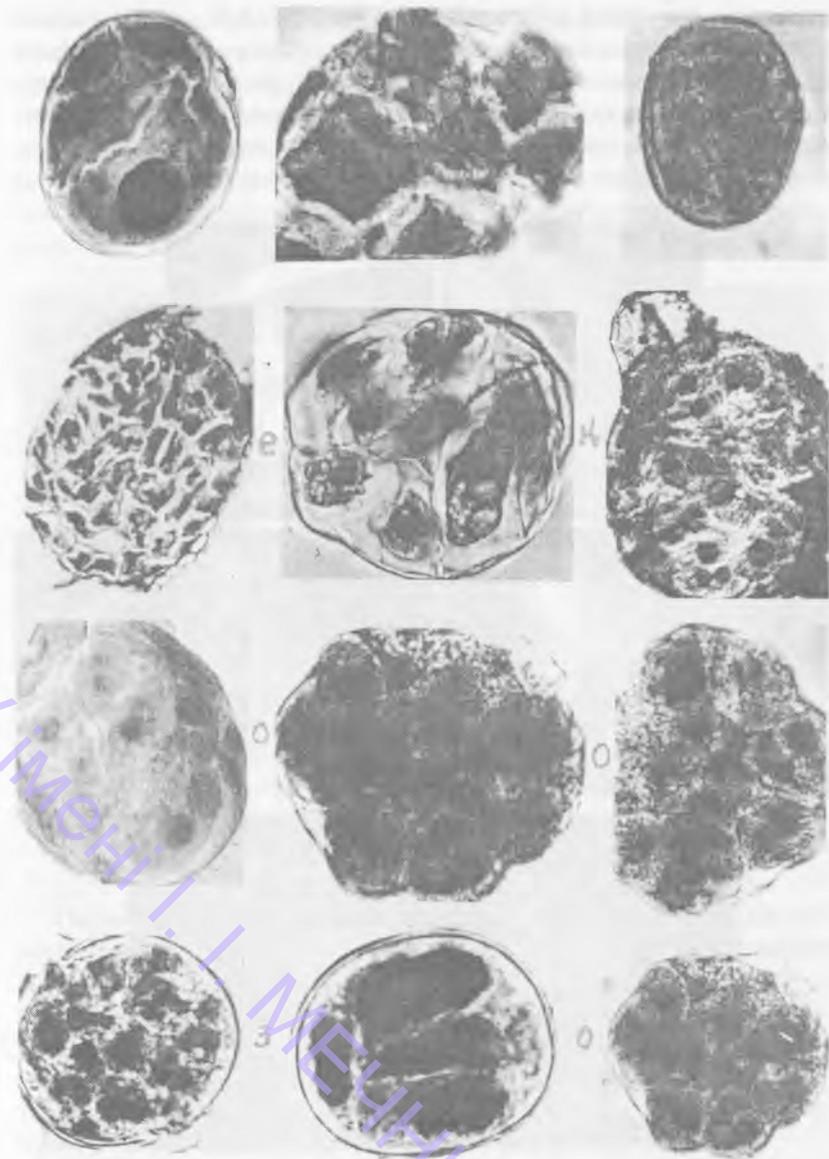


Рис. 1.4. Многоклеточные микроспоры в пыльниках тритикале и пшеницы (увеличение 1000×)

и пшеницы возникали с частотой 0,033 % — 0,248 % на питательных средах с добавлением глутамина и оксипролина в течение первой фазы индукционного периода. Ранняя регенерация (рис. 1.5) была характерна для макроструктур, появляющихся уже в течение первой фазы индукции — в первые две недели культивирования пыльников, вероятно, из-за подходящих для дифференцировки условий культивирования.

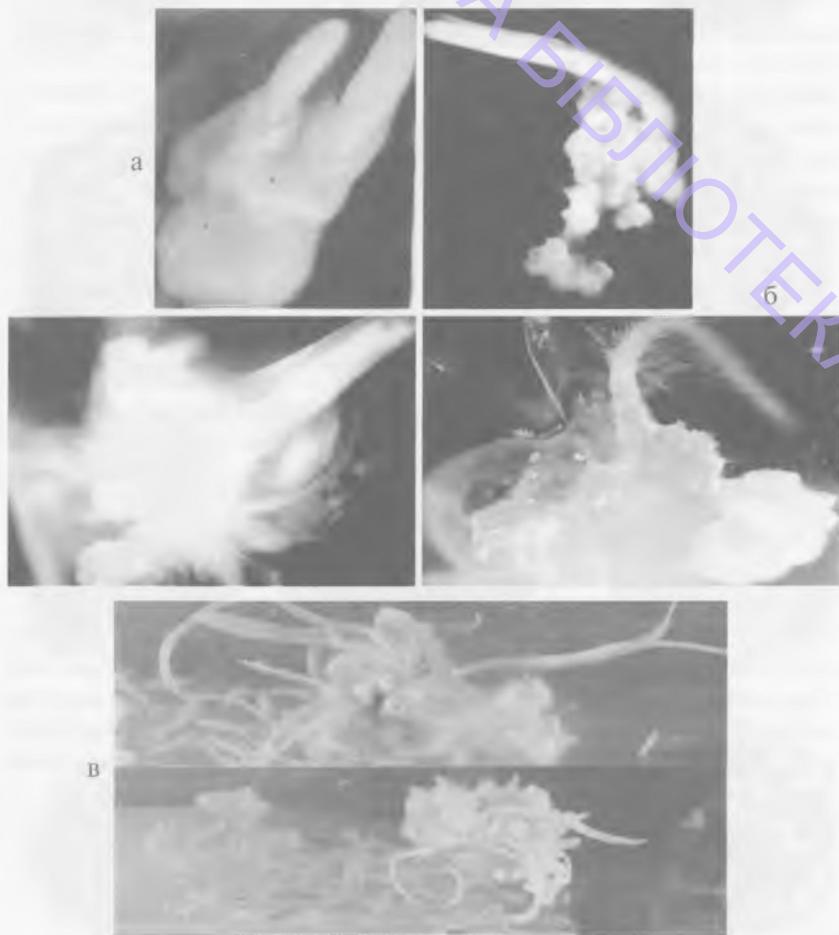


Рис. 1.5. Начало процесса регенерации в образованных макроструктурах на первичной среде в культуре пыльников тритикале и пшеницы (увеличение 8х, МБС-9)

Но это были лишь исключения. Массовая регенерация растений из сформированных в индукционном периоде новообразований (включавшая все описанные в литературе пути морфогенеза), как правило, начиналась в постиндукционном пассаже. Положительное влияние жидких сред при культивировании макроструктур и прохождении ими процесса регенерации позволило нам разработать оптимальные условия для микроразмножения регенерантов, подходящие для пшеницы и тритикале и увеличивающие выход их зелёных растений (рис. 1.6).

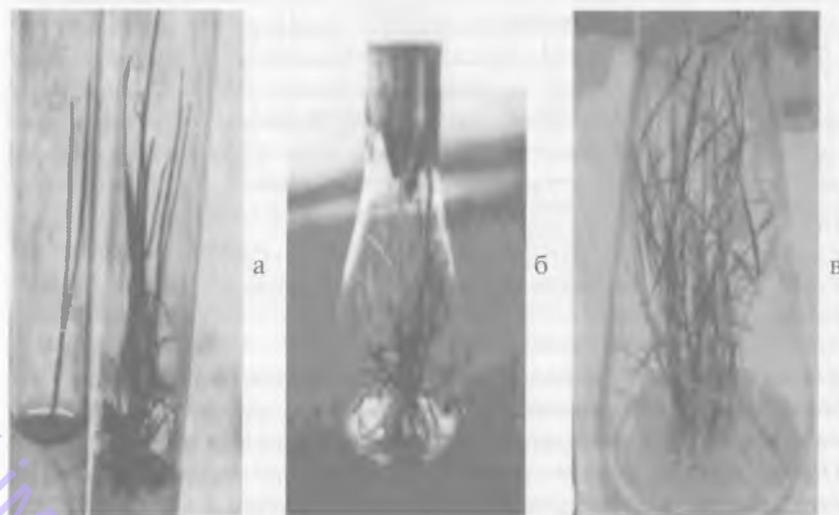


Рис. 1.6. Регенерация растений пшеницы и тритикале на твёрдых (а) и жидких средах (б, в)

Параметры выявленных оптимальных условий включали: снижение продолжительности фотопериода во время культивирования эксплантов (с 16 до 10 часов в сутки) и понижение температуры в культуральной комнате (12 °С — днём, 9 °С — ночью) в сочетании с оптимизированной жидкой питательной средой для культивирования. Используя эти условия в работе по получению гаплоидов, наблюдали увеличение количества образованных зелёных растений у тритикале в 7 раз, у пшеницы — в 6, по сравнению с контролем (табл. 1.3).

Обычно об эффективности биотехнологической системы судят по уровню параметров, определяющих её результативность при практическом использовании на большом объёме генотипов. Используя

Таблица 1.3

Влияние жидкой питательной среды, длины дня культивирования и пониженной температуры при культивировании новообразований на выход зелёных регенерантов тритикале и пшеницы из культуры пыльников

Генотип	Количество высаженных новообразований на вариант	Количество зелёных растений, шт.		Данные опыта, % от контроля
		26 °С, 16 час. день, твёрдая среда (контроль)	9–12 °С, 10 час. день, жидкая среда (опыт)	
Т 47\82 x Т 1137\82	11	18,0 ± 2,41	134,0 ± 5,17	744
Т 213\5 x Т Ляско	10	12,2 ± 1,36	75,0 ± 3,15	625
Пш. Triple Dirk	20	28,9 ± 2,37	157,1 ± 6,39	541
Пш. Centurk	10	13,0 ± 0,94	102,1 ± 6,29	785
Пш. Лан	5	6,0 ± 1,14	31,6 ± 2,98	533

Среднее = 15,6 ± 1,64 Среднее = 99,9 ± 4,79

НСР при P = 0,5; 2,813; 6,062.

Грасч. между вариантами блоками 82,523; 594,111; 13,591; 26,820.

Грасч. по фактору А 3389,68 по фактору В 313,32 взаимодействия 163,58 достоверно при P = 0,01.

в экспериментах различный генетический материал пшеницы и тритикале, наблюдали разную их морфогенетическую реакцию на этапах получения гаплоидов, и далее — при образовании диплоидов. Поэтапное проявление генотипами тритикале морфогенетических потенций в культуре пыльников по всем изученным показателям не зависело от уровня пloidности генотипов. В целом, высокий уровень регенерантов тритикале, так же как и зелёных растений, был получен в большей мере за счёт каллусных структур. Отмечено отсутствие связи между способностью к формированию новообразований и скоростью прохождения ими дальнейших этапов морфогенеза. При работе с пыльниками слабо «отзывчивого» материала тритикале для преодоления трудностей, связанных с морфогенезом в данной системе, показана возможность использования «высокоотзывчивых» генотипов — Дженкинс 59, Ад 1239, Ад Г 237 x ВСХИ и Ад 117 для передачи генетическим путём их способностей к успешному морфогенезу «неотзывчивым» формам. У тритикале выход удвоенных гаплоидов в экспериментах после проведения диплоидизации различными способами не превышал 50 %. Спонтанное удвоение гаплоидов было редким событием.

Выход альбиносных растений у тритикале зависел от генотипа донора и условий их выращивания. При этом их частота составляла 10–90 %. В то время как у пшеницы уровень хлорофиллдефектных растений хоть и зависел от генотипа, но колебался от 0 до 35 %. В результате экспериментов были получены веские основания для утверждения, что в гибридах тритикале за уровень «отзывчивости» в культуре пыльников отвечают оба партнёра.

В итоге, для получения гаплоидов тритикале через культуру изолированных пыльников были проведены образцы 35 популяций коллекционных форм и 65 популяций гибридов F<sub>1</sub>. Гибридные популяции, у которых были выявлены спонтанно удвоенные гаплоиды, составляли 58,5 % от всех испытанных.

У пшеницы около 90 % зелёных регенерантов представляли группу гаплоидов и гомозиготных спонтанных диплоидов. В отдельных опытах были отмечены иные соотношения между этими группами. До 50–65 % зелёных регенерантов были спонтанно удвоенными гаплоидами, что более предпочтительно для селекции, из-за наличия у них высокой фертильности. Проведенный нами поиск повышения эффективности гаплопродукции генотипов мягкой пшеницы в данной системе позволяет рекомендовать следующую процедуру проведения работы: отбирать для получения гаплоидов образцы с наиболее коротким периодом «всходы–колошение» или, точнее, — «всходы — вакуолизирующая микроспора», начиная отбор образца с 1-го побега в узле кушения, преимущественно в средне-поздней фазе развития микроспор в пыльниках. Для работы старались использовать пыльники из средней части колоса. Связь между регенерацией зелёных растений мягкой пшеницы и продолжительностью вышеуказанного периода развития микроспор отрицательная, корреляция составляла у исследованных сортов в среднем — 0,7, а у гибридов — 0,6. Для получения гаплоидов пшеницы рекомендуется использовать образцы с пониженной фотопериодической чувствительностью. Они, как правило, позитивно выделяются по показателям гаплопродукции, а особенно — по регенерации зелёных растений. Образцы с коротким периодом продолжительности яровизации также представляют интерес потому, что проявляют способность к увеличению частоты новообразований и повышению их регенерации. Выявлено позитивное влияние предобработки на срезанные побеги водного раствора АБК (0,1 мг/л — для яровых; 0,5 мг/л — для озимых), в темноте —

3 суток, при 2–4 °С. Культивирование пыльников мягкой пшеницы можно эффективно проводить на питательной среде 190–2 с добавлением 1,5 мг/л кинетина, 400 мг/л пролина и 400 мг/л глутамина. Регенерация проходит эффективно на среде MS с 0,5 мг/л кинетина, 0,1 мг/л ИУК и по 200 мг/л — пролина и глутамина. Образование зелёных растений достоверно увеличивается при добавлении в питательную среду 0,25 мг/л АБК. Культивирование морфогенных каллусов было результативным при дополнении MS среды для регенерации гибберелловой (0,5 мг/л) и яблочной (25 мг/л) кислотами и растворимым крахмалом (1 мг/л) при температуре культивирования 9–12 °С и 16-часовом фотопериоде [240, 250]. В результате проведения экспериментов по разработке комплекса условий для увеличения выхода гаплоидов у мягкой пшеницы выделены и рекомендуются к использованию для повышения её эффективности гаплопродукции генетические источники — украинские сорта мягкой пшеницы Чайка и Одесская красноколосая, английский сорт мягкой пшеницы Мара.

Проведение методических разработок на мягкой пшенице, взятой из селекционных посевов, позволило установить, что возможности данной гаплопродукционной системы позволяют биотехнологу широко манипулировать с разным генетическим материалом (табл. 1.4).

Таблица 1.4

**Влияние генотипа на эффективность этапов гаплопродукции озимых и яровых сортов мягкой пшеницы и их озимо-яровых гибридов**

Генотип	% эмбрионных пыльников	% новообразований	% регенерации растений	
			зелёных	хлорофилл-дефектных
Одесская 16 озимый	2,4 ± 0,06	4,3 ± 0,35	8,9 ± 0,58	0
Ciano 79 яровой	3,5 ± 0,15	4,1 ± 0,70	6,1 ± 0,66	1,5 ± 0,03
Чайка озимый	4,4 ± 0,12	10,4 ± 0,70	16,5 ± 0,92	8,8 ± 0,46
QT 4083 яровой	6,2 ± 0,63	12,4 ± 0,94	7,9 ± 0,55	13,3 ± 1,73
Одесская 16 x Ciano	2,7 ± 0,36	4,5 ± 0,30	14,0 ± 0,69	0,5 ± 0,44
Одесская 16 x QT 4083	3,3 ± 0,17	9,2 ± 0,15	19,0 ± 0,87	4,2 ± 0,46
Чайка x Ciano 79	4,0 ± 0,59	6,1 ± 0,18	1,6 ± 0,35	1,7 ± 0,40
Чайка x QT 4083	4,6 ± 0,34	8,4 ± 0,29	7,3 ± 0,35	6,6 ± 0,70
НСР	1,152	1,189	0,646	1,06
F расч. варьирования внутри вариантов:	176,322	10,082	63,966	748,431

Несколько ниже их уровень оказался у ярового сорта Ciano 79, и самый низкий показатель отмечен у озимой пшеницы Одесской 16. По регенерации зелёных растений — на первом месте 3,5 и 6 генотипы (табл. 1.5).

Таблица 1.5

**Влияние на результат гаплопродукции генотипа озимых и яровых сортов пшеницы и их озимо-яровых гибридов**

Генотип	Количество высаженных пыльников	Количество эмбрионных пыльников, шт.	Процент эмбрионных пыльников	Количество зелёных регенерантов	Процент зелёных регенерантов	Количество спонтанных удвоенных гаплоидов	Процент спонтанно удвоенных гаплоидов
Одесская 16	540	13	2,4	48	8,9	2	4,2
Чайка	1140	50	4,4	188	16,5	30	15,9
Ciano 79	660	23	3,5	40	6,1	0	0
QT 4083	660	41	6,2	52	7,9	2	3,8
Одесская 16 x Ciano	2220	59	2,7	312	14,0	120	38,4
Одесская 16 x QT 4083	2540	83	3,3	484	19,0	84	17,3
Чайка x Ciano	2060	82	4,0	32	1,6	0	0
Чайка x QT 4083	1860	85	4,6	136	7,3	50	36,7

НСР 0,98 4,74 12,59  
При P = 0,05

По спонтанно удвоенным гаплоидам — лучшим по-прежнему был сорт Чайка. Ciano 79 не показал результата, а оставшиеся — озимый и яровой сорта выявили одинаковое — крайне низкое значение этого показателя.

Однако у полученных озимо-яровых гибридов на их основе все исследуемые показатели выглядели совершенно иначе. По количеству эмбрионных пыльников в двух гибридных комбинациях озимого сорта Чайка с каждым из яровых значения были выше, чем у озимой пшеницы Одесской 16 — с обоими яровыми сортами. А по количеству зелёных растений у гибридов Одесской 16 с яровыми, в одном

и другом случае, наблюдалось значительное превышение над гибридами озимой Чайки с обоими яровыми сортами. Данный показатель у гибрида Одесской 16 более чем в 2 раза выше, чем у озимой Чайки с одним яровым сортом, и почти в 12 раз выше с другим яровым сортом Сiano, чем у гибрида Чайки с этим же яровым партнёром. По количеству спонтанно удвоенных гаплоидов в итоге оказался наиболее высокий результат у озимо-яровых гибридов, полученных с участием данных озимых и разных яровых партнёров — Одесской 16 — с Сiano, Чайки — с QT 4083. Проведя данный эксперимент и получив, на наш взгляд, необычные для пшеницы результаты по главным для селекционной работы показателям гаплопродукционного процесса, необходимо было проследить все отмеченные в опыте тенденции генотипических различий на более обширном количестве гибридного материала, с привлечением в качестве родительских компонентов озимых и яровых форм мягкой пшеницы.

Использование в работе 26 различных популяций  $F_1$  от скрещивания озимых форм с яровыми и озимых — с озимыми ещё раз подтвердило преимущество первых типов скрещиваний над вторыми по всем показателям процесса гаплопродукции. Так, из 26 популяций озимо-яровых гибридов у 23 были получены зелёные спонтанно удвоенные гаплоиды. В то время как из 28 чисто озимых гибридов — только 14 дали фертильные, спонтанно удвоенные гаплоиды.

Исходя из экспериментов по получению удвоенных гаплоидов на данных генотипах-донорах и изучения влияния их генетического статуса на эффективность гаплопродукции, был сделан вывод, что посредством включения в любую биотехнологическую систему таких доноров, как озимо-яровые гибриды пшеницы, можно добиться значительной эффективности процесса практически по всем его показателям. Этим можно поднять технологические возможности данной системы в целом на новый, более высокий уровень, и тем самым увеличить «востребованность» её селекцией в связи с появлением интересных, с селекционной точки зрения, гомозиготных форм озимой пшеницы.

В следующем совместном с селекционером эксперименте, проведенном в сугубо селекционных целях [463], на донорных генотипах пшеницы были получены прямые и обратные гибриды  $F_1$  между озимыми сортами одесской селекции Фантазия, Юннат и Чайка, и яровыми формами из мировой коллекции CIMMYT — MN 7529, SD 2968 и TMNU. В опыте по тестированию генотипов был определен уровень отзывчивости испытуемого материала. У 3 озимых

материнских форм уровень выхода удвоенных гаплоидов (от числа высаженных пыльников) можно было представить следующими значениями — 0 %, 12 %, 20 % (соответственно). У яровых сортов данный показатель составлял соответственно — 52 %, 48 %, 80 %. От озимо-яровых гибридов, полученных на основе скрещиваний озимых сортов Фантазии и Юнната с яровыми, получено 98 удвоенных гаплоидов (табл. 1.6).

Таблица 1.6

Получение удвоенных гаплоидов из популяции  $F_1$  озимо-яровых гибридов пшеницы

Гибридные комбинации	Количество высаженных пыльников	Количество удвоенных гаплоидов			Удвоенные гаплоиды, % от высаженных пыльников
		общее количество	озимые	яровые	
Фантазия x MN 7523	1600	33	18	15	2,06
Юннат x MN 7529	2220	36	14	22	1,62
Юннат x SD 2968	2000	36	17	19	1,80
Чайка x TMNU	2400	39	8	31	1,62

НСР 0,29 при  $P = 0,05$ .

Среди них, в основном из форм озимого типа развития, были выявлены образцы с проявлением высоких способностей ко всем этапам гаплопродукции, значительно превышавшие по всем показателям исходные озимые родительские генотипы. Из этого следует, что в формах с озимым типом развития удалось аккумулировать гены от яровых форм, ответственные за повышенную способность к реализации всех этапов андрогенеза. И в подтверждение этому, данные выявленные формы проявили эти качества на том же высоком уровне и в двух последующих поколениях (табл. 1.4, 1.5).

Полученные удвоенные гаплоиды из культуры пыльников всех использованных сортов и их гибридов явились результатом спонтанной диплоидизации. По гибридным комбинациям было получено от 33 до 39 линий с колебанием у них уровня выхода удвоенных гаплоидов от 1,62 до 2,06 %.

Всего в работе по данному направлению исследований было получено и передано для полевых испытаний 270 линий. Расщепление на озимые и яровые потомки составляло практически 1:1 в каждой гибридной популяции. Семена первого поколения озимых удвоенных гаплоидов были посеяны для изучения зимостойкости в полевых

условиях, и полученные из них растения были оценены на устойчивость к изолятам ржавчинного гриба (*Puccinia recondite*).

В результате оценки полученного в нескольких экспериментах линейного материала пшеницы по всем изучавшимся биологическим показателям хорошая зимостойкость была обнаружена у 6 линий.

Пять из них показали в дальнейшем хорошую «отзывчивость» в культуре пыльников, проявили хорошую зимостойкость в сочетании с устойчивостью к ржавчине, имели позитивную комбинацию других полезных показателей (табл. 1.7) и могли служить генетическими источниками повышенной способности к гаплопродукции для любого «низкоотзывчивого» материала озимой мягкой пшеницы [465].

Таблица 1.7

Характеристика линий, полученных из гаплоидов озимо-яровых и ярово-озимых гибридов пшеницы

Линия	F <sub>1</sub> комбинация	Удвоенные гаплоиды, частота в %	Уровень зимостойкости (в баллах)	Реакция на ржавчину
11(2)	MN 7529 x Фантазия	1,43 ± 0,94	4	R (S)
11(6)	MN 7529 x Фантазия	15,71 ± 0,71	5	R (S)
11(7)	MN 7529 x Фантазия	13,57 ± 0,33	5	S (S)
11(5)	MN 7529 x Фантазия	1,43 ± 0,84	1	R (S)
12(3)	Фантазия x MN 7529	6,43 ± 0,37	2	S (R)
22(2)	Чайка x TMNU	0,71 ± 0,65	4	R (S)
24(1)	Юннат x SD 2968	5,71 ± 0,27	5	R (S)
24(3)	Юннат x SD 2968	7,86 ± 0,40	4	RS

НСР 1,03  
F расч. варьирования между вариантами 264,400.  
Достоверно при P = 0,05.

Самой лучшей, по всем оцениваемым показателям, оказалась линия 11(7), полученная из спонтанно удвоенных гаплоидов от скрещивания ярового сорта MN 7529 и озимого сорта Фантазия, а самой худшей была линия из гибридной комбинации Чайка x TMNU.

В следующем сезоне при проверке «отзывчивости» пыльников этой линии в культуре *in vitro* её высокие гаплопродукционные способности были подтверждены.

Частота удвоенных гаплоидов, выявленная в этом опыте, в среднем по нескольким регенерантам линии 11\7 была равна 14,3 % от числа высаженных пыльников (табл. 1.8).

Таблица 1.8

Андрогенетическая способность отобранных линий удвоенных гаплоидов озимой пшеницы, полученных из гибридов F<sub>1</sub>

Удвоенный гаплоид	Комбинация скрещивания	Процент удвоенных гаплоидов от числа высаженных пыльников		
		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
1\2	MN7529 x Юннат	3,1 ± 0,40	2,7 ± 0,52	6,5 ± 0,20
11\7	MN7529 x Фантазия	7,5 ± 1,55	18,3 ± 1,27	17,1 ± 1,09
24(1)	Юннат x SD 2968	2,8 ± 0,58	3,6 ± 1,05	4,5 ± 0,72
24(3)	SD 2968 x Юннат	6,3 ± 1,15	7,2 ± 1,50	9,8 ± 1,21

НСР по всему опыту 2,315.  
F расч. варьирования между сортами внутри вариантов 44,395.  
Достоверно при P = 0,05 между блоками 8,007.

Таким образом, включением в культуру пыльников таких донорных генотипов мягкой пшеницы, как озимо-яровые гибриды, можно не только поднять на более высокую ступень результативность данной биотехнологической системы гаплопродукции, но и сделать частым событием выявление новых генетических источников с высоким уровнем «отзывчивости к гаплопродукции» в сочетании с благоприятными характеристиками хозяйственно-ценных признаков. Одновременно с этим ещё и помочь селекции в деле создания перспективного исходного материала для ускоренной реализации его в новые линейные сорта озимой мягкой пшеницы [223].

Следующим направлением проведенных исследований по использованию культуры пыльников пшеницы в практическом аспекте явилось получение гомозиготных линий из разных поколений отдалённых гибридов пшеницы различных типов скрещиваний.

В последнее десятилетие отдалённая гибридизация пшеницы с ближними и дальними, дикими и культурными сородичами по семейству получила широкое развитие в разных странах мира. Успехи этого генетико-селекционного направления в растениеводстве выразились в создании таких культур на основе мягкой пшеницы, как озимая твёрдая пшеница и тритикале. С созданием различного типа гибридов пшеницы и интрогрессивных форм на её основе генетики и селекционеры связывают большие надежды на расширение генофонда пшеницы по важным для её улучшения признакам. В первую очередь, по качеству зерна и устойчивости к биотическим и абиотическим факторам окружающей среды [276, 466]. Однако стабилизация такого материала

традиционными методами является длительной процедурой, задерживающей его передачу на селекционное или генетическое изучение. При проведении такой работы культура пыльников обладает рядом преимуществ, по сравнению с традиционными способами, и особенно — по выигрышу во времени стабилизации полученного материала. Потому она всё больше привлекает внимание генетиков и селекционеров, работающих с отдалёнными гибридами различных злаков, в том числе и пшеницы [467, 468]. В основном, данный биотехнологический метод используется как для достижения константности гибридов, так и быстрого получения из их популяций генетически стабильного разнообразия интрогрессивных и разных уникальных гибридных форм.

Экспериментальная работа с отдалёнными гибридами пшеницы в направлении получения удвоенных гаплоидов была проведена с нашим участием на популяциях растений 55 донорных генотипов, которые представляли собой чужеродно-интрогрессивные формы после их беккроссирования материнской формой. Доноры для культуры пыльников были представлены растениями из популяций гибридов четвертого и пятого поколений от скрещиваний сортов озимой мягкой пшеницы — Обрий, Одесская полукарликовая и Донская полукарликовая с различными представителями рода *Aegilops* — *A. cylindrica*, *A. ventricosa*, *A. squarrosa* (*T. tauschii*), *A. variabilis*, и сородичами пшеницы — *T. palmovae*, *T. araraticum*, *T. erebuni*, *T. dicocoides* и амфидиплоидом *Avrosis*. Пыльники всех форм были высажены в разработанные и предложенные нами для данной работы условия культивирования [469, 470, 471].

По полученным результатам было отмечено, что, в отличие от пшеницы, среди всех этих форм выявлено 7 «неотзывчивых» генотипов, у которых вообще не наблюдалось образования эмбриогенных пыльников. Характеристики «отзывчивых» генотипов представлены в таблице 1.9.

От всех изученных гибридных комбинаций было получено 523 зелёных растения, но только 76 из них были спонтанно удвоенными гаплоидами. По уровню полученных зелёных регенерантов из сформированных в культуре пыльников новообразований (% от высаженных пыльников) генотипы можно было расположить в 4 группы, в которых выделялся лидер по данному показателю: 1 — Обрий х *T. tauschii* —  $10,34 \pm 0,53$ , 2 — Одесская полукарликовая (п\к) х *T. palmovae* —  $6,48 \pm 0,75$ , 3 — Донская п\к х *A. ventricosa* —  $0,65 \pm 0,11$ , 4 — Обрий х *T. araraticum* —  $0,06 \pm 0,06$ . В опытных данных была выявлена определённая взаимосвязь.

Таблица 1.9

Реализация регенерационного потенциала у интрогрессивных форм пшеницы в культуре пыльников

Комбинация скрещиваний	Высажено пыльников	Эмбриогенные пыльники		Зелёные растения	
		шт.	процент	шт.	процент
BC <sub>1</sub> F <sub>3</sub> Донецкая полукарликовая х <i>T. ventricosum</i> 2n 28	5220	246	4,7 ± 0,3	34	0,65 ± 0,11
BC <sub>1</sub> F <sub>3</sub> Донецкая полукарликовая х <i>T. peregrinum</i> 2n 28	3480	168	4,8 ± 0,4	22	0,63 ± 0,13
BC <sub>1</sub> F <sub>4</sub> Обрий х <i>T. tauschii</i> 2n 14	3240	363	11,2 ± 0,6	335	10,34 ± 0,53
BC <sub>1</sub> F <sub>4</sub> Обрий х <i>T. Timopheevii</i>	1560	90	5,0 ± 0,6	1	0,06 ± 0,06
BC <sub>1</sub> F <sub>4</sub> Обрий х ( <i>F</i> <sub>3</sub> Одесская полукарликовая х Аврозис)	5100	247	4,8 ± 1,3	35	0,69 ± 0,12
BC <sub>1</sub> F <sub>4</sub> Обрий х <i>T. palmovae</i> 2n 28	480	46	9,6 ± 0,3	26	5,42 ± 1,03
BC <sub>1</sub> F <sub>6</sub> Одесская полукарликовая х <i>T. palmovae</i>	1140	53	4,9 ± 0,6	70	6,48 ± 0,75

Различия достоверны при P = 0,01.

Так, если процент индукции эмбриогенных пыльников достигает по комбинации более 4,5 %, то регенерация зелёных растений в ней наблюдается. В случае снижения показателя регенерации ниже 2 % уровень выхода зелёных регенерантов снижался до нуля.

В работе с отдалёнными гибридами на основе пшеницы наиболее важным показателем эффективности получения линейного материала является частота спонтанной диплоидизации. И как видно из таблицы, её величина была выше в группе с низким уровнем регенерации зелёных растений. Хотя по количеству удвоенных гаплоидов на первом месте оказался гибридный генотип из средней группы Одесская п\к х *T. palmovae*, у которого было получено 36 растений.

Однако из комбинаций группы — с самым низким выходом зелёных растений — Донская п\к х *A. variabilis* удалось выделить два номера с высокой устойчивостью к фузариозной гнили колоса.

В условиях проведенного эксперимента [471] между семьями одной гибридной комбинации, а иногда и между растениями внутри одной

семьи в некоторых комбинациях, можно было с высокой достоверностью наблюдать значительные различия по уровню отдельных показателей гаплопродукционного процесса. Очевидно, что влияние на появление гаплоидов оба родителя оказывают в разной мере.

Результаты данной экспериментальной работы дают основания считать, что на уровне популяций отдалённых гибридов влияние генотипического фактора каждого отдельного растения на этапы гаплопродукционного процесса является непредсказуемым и несравнимым с тем, что наблюдалось у исходных форм пшеницы (табл. 1.10, 1.11).

Таблица 1.10

**Гаплопродукционная способность семей гибридной комбинации  $BC_1F_4$  Обрий х *T. tauschii***

Семья	Высажено пыльников	Эмбриогенные пыльники		Зелёные регенеранты	
		шт.	процент	шт.	процент
1	120	23	19,2 ± 3,6	12	10,0 ± 2,7
5	660	184	27,9 ± 1,8	292	44,2 ± 1,9
6	480	20	4,2 ± 0,9	0	0
8	360	13	3,6 ± 1,1	0	0
12	780	7	0,9 ± 0,3	0	0
32	840	116	13,8 ± 1,2	31	3,7 ± 0,7

Различия достоверны при  $P = 0,05$ .

При этом для работы с отдалёнными гибридами пшеницы важно, что среди её диких сородичей (разных видов эгилопсов и дикорастущих пшениц), использующихся в скрещиваниях в качестве отцовских форм, встречаются представители, обладающие позитивным влиянием сразу на два главных показателя результативности процесса — на выход зелёных растений и затем — на образование из них спонтанно удвоенных гаплоидов (табл. 1.12).

По нашему мнению, проведение в таких случаях предварительного тестирования на отзывчивость к гаплопродукции отцовского родителя, привлекаемого для отдалённых скрещиваний с пшеницей, может придать больше уверенности в успехе и позволит планировать новые интересные эксперименты. Это обстоятельство может способствовать расширению технологических возможностей культуры пыльников, а также ещё и более эффективному её использованию в таком экспериментальном направлении, как отдалённая гибридизация в роде *Triticum* [700].

Таблица 1.11

**Выход спонтанно удвоенных гаплоидов у чужеродно-интрогрессивных форм пшеницы в культуре пыльников**

Комбинация скрещивания	Зелёные регенеранты, шт.			Частота спонтанной диплоидизации %
	высажены в почву	выкопались	диплоиды	
$BC_1F_3$ Донецкая полукарликовая х <i>T. ventricosum</i> 2n 28	34	18	1	5,6 ± 0,4
$BC_1F_3$ х Донецкую полукарликовую х <i>T. peregrinum</i> 2n 28	22	18	16	88,9 ± 7,4
$BC_1F_4$ Обрий х <i>T. tauschii</i> 2n 14	335	135	26	19,3 ± 3,4
$BC_1F_4$ Обрий х <i>T. temopheevii</i>	1	1	0	0
$BC_1F_4$ Обрий х ( $F_3$ Одесская полукарликовая х Аврозис)	35	25	4	16,0 ± 7,3
$BC_1F_4$ Обрий х <i>T. palmovae</i> 2n 28	26	21	8	38,1 ± 10,6
$BC_1F_6$ Одесская полукарликовая х <i>T. palmovae</i> 2n 28	70	40	21	52,5 ± 7,9

Различия достоверны при  $P=0,05$ .

Таблица 1.12

**Образование зелёных растений-регенерантов в культуре пыльников пшенично-эгилопсных гибридов**

Генотип	Высажено пыльников на среды	Зелёные регенеранты		
		высажено в почву	получено фертильных растений	% спонтанно удвоенных
Популяция Обрий х <i>A. squarrosa</i>	660	292	16	14,5 ± 1,06
Популяция Донская п\к х <i>A. ventricosa</i>	1320	1	0	0
Популяция Обрий х <i>T. palmovae</i>	1080	70	21	52,5 ± 1,04
Популяция Донская п\к х <i>A. Ventricosa</i>	540	27	1	6,7 ± 1,04

Достоверно при  $P = 0,05$ .

В продолжение работы с отдалёнными гибридами на основе пшеницы было проведено получение удвоенных полигаплоидов из популяции пшенично-пырейного гибрида  $F_1$  амфиплоида *Agrotriticum* (*T. durum* x *A. elongatum*,  $2n = 42$ ) x *C. Spring*, после беккроссирования гибридных растений 5 сортами озимой мягкой пшеницы — Мионовская 808, Одесская 16, Чайка, Эритроспермум 127 и Одесская полукарликовая. В результате были получены гибридные зерновки, растения из которых использовали в качестве донорных форм для отбора пыльников. В опыт в качестве доноров пыльников были включены фертильные растения пшеницы с признаками пырея [499]. Получение зелёных регенерантов в опыте было генотипически зависимым, и их уровень варьировался в популяциях в интервале значений 0–35 %. Две из комбинаций — от беккроссирования Чайкой и Эритроспермум 127 — показали высокий уровень продукции спонтанно удвоенных гаплоидов среди зелёных регенерантов. Общее число полученных зелёных регенерантов в этих комбинациях — 137, из них 44 были фертильными. Вследствие хромосомной стабильности пшеничных бивалентов (как было выявлено в профазе М 1) улучшенной оказалась озёрность колосьев этих растений. Исходя из результатов использования разработанной нами технологии получения гаплоидов, и на их основе — гомозиготных линий из межсортовых гибридных популяций мягкой пшеницы и из популяций различного гибридного материала с её участием, можно отметить следующее. В проведенных экспериментах, когда в качестве донорного материала было использовано 105 межсортовых, сортовых популяций и популяций отдалённых гибридов, получено 5160 зелёных растений, результат регенерации по всем генотипам составил в среднем 11,09 % от высаженных пыльников. Было получено 1323 удвоенных гаплоида (спонтанных и после колхицинирования) из общего числа зелёных растений, относящихся к данной работе. Это составляло 25,6 %. Выход спонтанно удвоенных гаплоидов (от полученных зелёных растений в среднем по всем гибридам) составлял 9,8 %, при достигнутом максимуме их в отдельной комбинации — 38,4 %. Полученные в разных экспериментах удвоенные гаплоиды пшеницы в количестве более 2 тысяч были переданы в качестве линейного материала для осуществления различных селекционных программ, направленных на улучшение мягкой пшеницы.

Таким образом, на основе системного подхода к изучению процесса гаплопродукции в культуре пыльников пшеницы и тритикале

и исследования факторов, лимитирующих этот процесс, была разработана новая биотехнология (рис. 1.7, 1.8) создания гомозиготных линий из коллекционных форм, сортовых и гибридных межсортовых популяций тритикале и пшеницы, и различных поколений их отдалённых гибридов.

Достигнутая эффективность методических приёмов, являющихся базисом данной биотехнологии, позволяет оперировать с обширным объёмом исследуемого материала различной генетической сложности и получать приемлемый выход удвоенных полигаплоидов для проведения целевых селекционно-генетических программ.

В результате большого объёма проведенной работы достижение гомозиготности у полученных линий было доказано для растений из гибридных популяций тритикале и из гибридного материала с участием мягкой пшеницы с разной генетической конституцией: гибриды простые и сложные, реципрокные, отдалённые — межвидовые и межродовые (как первичные формы, так и полученные после разных уровней беккроссов).

Интенсификация этапов гаплопродукции позволила достичь довольно высокого уровня получения гаплоидов и гомозиготных линий из них из генетического материала на основе пшеницы и тритикале. И тем самым открылась возможность ускоренного получения новых константных форм, необходимых селекции. Это дало полное право считать данную систему *in vitro* биотехнологией создания линейного генетического материала указанных культур с целью использования его в разных селекционных программах, осуществляемых на юге Украины.



Рис. 1.7. Технологические этапы гаплопродукционного процесса, регенерация в твердых (а) и жидких средах (б, в)



Рис. 1.8. Технологические этапы гаплопродукционного процесса, регенерация в твердых (а) и жидких средах (б, в)

## МЕТОД ЭМБРИОКУЛЬТУРЫ — БАЗИС BIOTEХНОЛОГИЙ СОЗДАНИЯ ГАПЛОИДОВ И РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ГИБРИДОВ ПРИ ОТДАЛЁННОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ ЗЛАКОВ

### 2.1. МЕТОД ГАПЛОПРОДЮСЕРОВ В СОЗДАНИИ ГАПЛОИДОВ У ЗЛАКОВ: ЕГО ОСНОВА, РАЗВИТИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ В РАЗНЫХ СТРАНАХ ПО ИЗУЧЕНИЮ ФАКТОРОВ РЕЗУЛЬТАТИВНОСТИ МЕТОДА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ЕГО В СЕЛЕКЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ РАБОТЕ С ЯЧМЕНЁМ И ПШЕНИЦЕЙ

Другим методом *in vitro*, являющимся базовым для различных интенсивно разрабатываемых технологий получения генетически ценного и перспективного материала для селекции злаков, является эмбриокультура — культура *in vitro* незрелых и зрелых зародышей.

В первом аспекте большой практический и научный интерес представляет широко используемая для получения гомозиготных линий ячменя и постоянно совершенствующаяся гаплоидная технология на основе метода эмбриокультуры незрелых зародышей, получаемых при межвидовом скрещивании культурных форм *Hordeum vulgare* с гаплопродюсером — многолетней самостерильной луковичной формой *Hordeum bulbosum* 2х. В результате скрещиваний этого типа в гибридной зерновке на ранних этапах её развития, как правило, происходит генетическая элиминация хромосом *H. bulbosum*. После чего гибридный зародыш обретает гаплоидный статус *H. vulgare* и может быть использован для получения гаплоидных растений, а из них после диплоидизации — гомозиготных линий для генетических и селекционных программ. Хотя есть данные, что в некоторых партнёрских парах этого типа скрещивания, в результате неполной элиминации хромосом *H. bulbosum* в гибридном зародышевом мешке, могут образовываться и гибриды с конституцией VB, VBB, VVBB [231].

Первые данные об использовании данных комбинаций скрещивания для получения гаплоидов ячменя были представлены Davies [226] и затем подтверждены цитологическим анализом, проведенным Subrahmanyam и Kasha [227, 228], которыми был показан ход элиминации хромосом *H. bulbosum* в полученном от скрещивания гибридном зародышевом мешке, и в результате доказано образова-

ние гаплоидного зародыша *H. vulgare*. Было также установлено, что процесс элиминации хромосом *H. bulbosum* в гибридных эмбрионах происходит постепенно и после оплодотворения яйцеклетки длится с 3-го по 11-й день их развития. В дальнейшем, на телотрисомных линиях было показано, что за генетический контроль элиминации хромосом гаплопродюсера ответственны генетические факторы, локализованные на обоих плечах 2-й хромосомы и на коротком плече 3-й хромосомы *H. vulgare* [229].

На основе цитологических исследований различными авторами были выдвинуты гипотезы по поводу механизма хромосомной элиминации, обобщенные Kasha [231]. Главные положения этих гипотез состоят в следующем: при гибридизации указанных партнёров элиминация имеет место вследствие асинхронности процесса во времени прохождения митотического цикла, что проявляется из-за видовых различий. Однако ни одна из гипотез так и не заняла место главной в объяснении природы процесса элиминации, которая во многом оставалась ещё неясной и нуждалась в дальнейшем изучении. Явление хромосомной элиминации, наблюдаемое в гибридах между *H. vulgare* и *H. bulbosum*, отмечалось и в 19 других межвидовых скрещиваниях в роде *Hordeum*, из 37 изученных [232]. В этой связи было высказано мнение [228], что в роде *Hordeum*, в зиготе межвидовых гибридов возникают специфические взаимоотношения родительских геномов, которые определяют либо сохранение хромосом обоих родителей, как в гибридах, либо элиминацию хромосом одного из них, приводящую к образованию гаплоидов. Наибольшее число гаплоидов в работах разных авторов удавалось получить при скрещивании с формой *H. bulbosum*.

Показано, что возможность получения гаплоидов зависит от обоих генотипов-партнёров, но количественный её уровень, в большей мере — от клона *H. bulbosum* [229, 231, 234]. В гибридных зерновках от скрещивания *H. vulgare* и *H. bulbosum* клеточное деление и рост гаплоидного зародыша идёт медленнее, чем при образовании диплоидного эмбриона при внутривидовой гибридизации, а развитие эндосперма прекращается через пять дней после опыления [227]. Это приводит к образованию недифференцированных гаплоидных зародышей, которые при дальнейшем пребывании в зерновке погибают. Поэтому необходимо их вычлечение и последующее выращивание в условиях *in vitro* из них растений [227].

Как показали данные, представленные различными исследователями [229, 231, 232, 236], результативность скрещиваний между

*H. vulgare* и *H. bulbosum* как метода создания гомозиготных линий культурных форм ячменя зависит от множества факторов, как это имеет место при отдалённой гибридизации любых злаков. Это — генотипы обоих партнёров, техника кастрации и опыления, условия выращивания растений в период проведения гибридизации, наличие барьеров про- и постгамной несовместимости, точность определения сроков максимальной дифференциации гаплоидных зародышей, процедура их вычленения, комплекс условий для получения и культивирования гаплоидных растений *in vitro* и их диплоидизация.

Для обеспечения результативности работы важным является: выбор компонентного состава питательных сред для всех этапов процесса — начиная от дня высадки зародыша (исходя из степени дифференцированности и его аномальности) и до получения полноценного диплоидного растения. Не менее важен и подбор лучшего клона гаплопродюсера. В результате проведенной Kasha оптимизации сред и условий культивирования зародышей и полученных из них растений, а также использования наиболее подходящих клонов *H. bulbosum* 2х, ему удалось увеличить выход гаплоидов *H. vulgare* до 50 % [231]. Датчанину Jensen удалось довести выход гаплоидов — до 53 % [236]. Как показано Лукьянюк [33], у отдельных генотипов ярового ячменя, при использовании оптимально подобранных клонов гаплопродюсера, уровень выхода гаплоидов в климатических условиях зоны юга Украины в максимуме достигал 45 %. После первых публикаций авторов по использованию данной техники в селекционных и генетических исследованиях внимание к ней значительно усилилось у биотехнологов разных стран. В каждой исследовательской группе совершенствование метода проводилось по различным параметрам, в зависимости от поставленных задач, целей применения и климатических условий для проведения работы и имеющихся генотипов гаплопродюсера. В 2000 году успехи в использовании этих разработок в селекции ячменя различных стран были представлены на 8 Международном генетическом симпозиуме по ячменю в Австралии. Полученные методом «*bulbosum*» линии к этому времени уже удалось реализовать в 53 сорта в 7 странах мира — Дании, Канаде, Новой Зеландии, Франции, Польше, СССР, Англии [224].

Гаплоиды на основе этого же гаплопродюсера впервые были получены Barclay у яровой мягкой пшеницы *C. Spring*. Затем эти результаты были подтверждены работами Snape et al. [237, 238]. И при этом в обоих случаях ими была показана генетическая элиминация

хромосом дикой формы *H. bulbosum* 4х. Вероятность успешного её прохождения, по мнению авторов, увеличивается, когда в материнском генотипе пшеницы гены *Kr1* и *Kr2* находятся в двойном рецессиве. Это положение было подтверждено [239] в парах скрещиваний сортов мягкой пшеницы *C. Spring* и *Gamut*. Оказалось, что ржаная транслокация 1A — 1RS (как в сорте пшеницы *Amigo*) может стать маркером увеличенной способности к гаплопродукции при скрещивании с *H. bulbosum*. Однако даже самый высокий уровень выхода гаплоидов — 9 %, выявленный у отдельных генотипов мягкой пшеницы, не позволяет рассчитывать на широкое использование гаплопродюсера *H. bulbosum* 4х для пшеницы.

Показано, что для ячменя, наряду с *H. bulbosum*, в качестве гаплопродюсера можно использовать также некоторые диплоидные формы *Secale cereale* [242, 243]. В этих работах гаплоидные растения были получены только у определённых сортов диплоидного ячменя *H. vulgare* и диплоидной ржи сортов *Prolific* и *Petkus*. В других опытах гаплоиды *H. vulgare* удавалось получить и с помощью видов ржи *S. Vavilovi* и *S. dihicoricum* [244]. Однако по формированию в них гаплоидных зародышей и получению из них растений рожь, как гаплопродюсер, всегда уступала *H. bulbosum* 2х. По вопросу механизма получения гаплоидов ячменя при скрещивании с рожью мнения исследователей неоднозначны. Одни считают, что при этом проходит генетическая элиминация хромосом ржи путём фрагментации [244], другие — отстаивают партеногенетический путь происхождения гаплоидов [245]. Тем не менее, в определённых случаях использование ржи в качестве гаплопродюсера для ячменя вполне оправдано. Так как возможность получения гаплоидов посредством этого пути весьма вероятна, и также может быть полезной в аспекте интересующих селекционера интрогрессий генов ржи в ячмень, как это показано Bates et al. [246].

Продукция гаплоидов пшеницы через хромосомную элиминацию была привлекательной идеей для разработки технологии потому, что представлялась технически простой и менее дорогостоящей, по сравнению с культурой пыльников. Эти доводы заставляли исследователей продолжать поиск эффективных гаплопродюсеров для пшеницы в других родах семейства злаковых [247, 248]. В конце 80-х годов появившиеся работы Laurie и Bennett [249–253] и Laurie и Reymondie [254] по скрещиванию пшеницы (*T. aestivum*) с кукурузой (*Zea mays*) показали возможность развития новой гаплоидной технологии пше-

ницы на основе механизма генетической элиминации хромосом кукурузы в образовавшейся в зародышевом мешке пшеницы гибридной зиготы. Ключевым моментом, лимитирующим реализацию этого пути в получении растений из гаплоидных зародышей, является очень низкая их жизнеспособность вследствие недоразвития или полного отсутствия эндосперма в образовавшейся «зерновке». Так как зародыши из таких комбинаций скрещиваний вследствие низких темпов их развития после оплодотворения находятся на очень ранних этапах формирования — преимущественно на стадии pre-embryo — их вычленение может не привести к регенерации жизнеспособных растений. Считают [255], что при таких условиях процесса эмбриогенеза и получения гаплоидов от растений данного типа скрещиваний использование техники embryo-rescue, из-за низкой жизнеспособности зародышей, неэффективно. В этих случаях наиболее результативным путём, по мнению исследователей, является культура колосков *in vitro*, благодаря которой удаётся в течение 3 недель при дополнительном культивировании на питательной среде с 2,4-Д (когда возможна стимуляция дополнительных делений в гаплоидном зародыше) дорастить недифференцированные зародыши в зерновках, а затем их вычленивать и получить растения. Исследователями разработаны оптимальные условия культивирования для каждого из указанных этапов и предложены питательные среды. Описан вариант использования техники embryo rescue, когда зародыш вычленяется на стадии pre-embryo и помещается на питательную среду с 2,4-Д. После получения на ней каллуса проводится регенерация растений. Авторы считают, что развитие таких зародышей можно ускорить, если после опыления кукурузной пылью сделать инъекцию 2,4-Д в основание опыляемого колоса пшеницы.

В результате использования вышепредложенных путей у мягкой пшеницы, в зависимости от обоих родительских генотипов (кукурузы в большей степени), удаётся довести уровень образования зародышей до 50 % и более. Однако пока ещё остаётся невысоким процент выхода из них гаплоидных растений. По данным разных авторов, он составляет 28–75 % (253). По мнению разных исследователей, этот уровень можно преодолеть совершенствованием техники эмбриокультуры и условий культивирования зародышей на всех этапах, и также использованием оптимально подходящего генотипа кукурузы в качестве гаплопродюсера. Самое важное, что эту систему получения гаплоидов пшеницы считают весьма перспективной для использования, и даже

более эффективной по сравнению с «бульбозным» методом, когда имеются условия фитотрона и возможности для совмещения сроков цветения и гибридизации генотипов пшеницы и кукурузы [256, 257].

Разработка этой биотехнологии получения гаплоидов представляет интерес и реальную перспективу её использования для других экономически важных видов пшеницы, как например, *T. turgidum* и *T. durum* [258], для которых не предложено оптимальных условий получения гаплоидов другими приёмами.

### 2.1.1. Разработка параметров биотехнологической системы получения гаплоидов и удвоенных гаплоидов ячменя на основе скрещиваний его генотипов с гаплопродюсерами — *H. bulbosum* и *S. cereale* для использования результатов работы в целях селекции ячменя в Украине

Поскольку создание гаплоидов ячменя вышеуказанными путями базируется на функционировании механизма генетической элиминации хромосом гаплопродюсера в гибридной зерновке от скрещивания его с культурной формой *H. vulgare* и формировании её гаплоидного зародыша, нами на разных генотипах ячменя были проведены исследования по улучшению условий опыления и завязываемости зерновок. Для этого испытаны различные варианты обработки цветков кастрированных колосьев *H. vulgare*. Исследования темпов прохождения эмбриогенеза в гибридных зерновках, полученных от опыления колосьев *H. vulgare* в 2 вариантах — собственной пылью и пылью *bulbosum*, позволили установить время дифференциации формирующихся зародышей гаплоидного типа, и после вычленения их из зерновки определить срок их готовности к автономному росту в условиях *in vitro* (рис. 2.1)



Рис. 2.1. Развитие диплоидного зародыша (А) и гаплоидного — от скрещивания с гаплопродюсером (Б) на 10-й–12-й день после опыления

После опыления цветков культурных форм ячменя пыльцой *H. bulbosum* предложено проводить обработку их смесью гибберелловой кислоты (ГК) в концентрации 75 мг/л и 15 мг/л борной кислоты. В полевых опытах нами был определён эффективный вариант обработки опыленных колосьев — пролином (200 мг/л), оказывающий позитивное влияние на параметры процесса гаплопродукции (табл. 2.1).

Таблица 2.1

Влияние обработки пролином кастрированных колосьев *H. vulgare* перед опылением *H. bulbosum* на выход гаплоидных растений

Комбинация скрещивания	Контроль (без обработки)			Пролин 200 мг/л		
	Завязываемость зерновок, %	Высажено эмбрионов, шт.	Получено растений, шт., (%)	Завязываемость зерновок, %	Высажено эмбрионов, шт.	Получено растений, шт., (%)
F <sub>1</sub> (2258 x Мираж) x <i>H. bulbosum</i>	12,1	17	0	29,5 ± 0,40	30	12 (40,0)
F <sub>1</sub> (4052 x Одесский 46) x <i>H. bulbosum</i>	13,9	29	3 (10,3)	36,1 ± 0,85*	44	17 (38,6)*

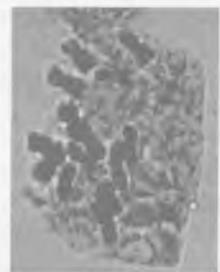
\*Различия достоверны при P — 0,05.

Эксперимент на гаплоидных зародышах, полученных в сроки от 8 до 12–14 суток от момента опыления, позволил определить, что на минимальной питательной среде — с присутствием в ней макро- и микросолей, 3 % сахарозы, в отсутствие экзогенных регуляторов роста, зародыши этих сроков развития не прорастали. Т. е. полной автономностью, как диплоидные зародыши, они не обладали. Индуцировать прорастание их на основе относительной автономности можно было различными путями, которые определялись размерами и степенью дифференциации. На среде ГБ-5 с витаминами, с 1 мг/л ИУК и с 1 мг/л кинетина гаплоидные зародыши прорастали тогда, когда их размеры превышали 1,6 мм, и они были нормально сформированы и дифференцированы. Процесс проходил при культивировании их в темноте более 2 недель при температуре 20–22°C. Для зародышей размером 1 мм, находившихся в разной степени дифференциации, использована предложенная нами среда Р8 с приведенным выше её составом. Установлено, что для гаплоидных зародышей менее 1,0 мм и с различными аномалиями в морфологии подходящим являлся вариант среды Р8 с добавлением 0,1 мг/л абсцизовой кислоты (АБК)

и культивирование такого типа структур эмбрионов в течение двух недель в темноте при 25–26 °С с последующей пересадкой на свежую среду Р8 (без АБК), с 200 мг/л пролина и глутамина при рН 5,5, и с дальнейшим выращиванием на 16-часовом фотопериоде при освещённости 3 тыс. люкс до получения регенерантов.

Использование приёма дорастивания зерновок с зародышами, образованными *in situ*, при срезке побегов материнских растений на 5-й день после опыления и содержании их в климатической камере до дня вычленения, даёт возможность сохранить жизнеспособность развивающихся гаплоидных зародышей, выделенных из растений, выросших в полевых условиях при воздействии физиологической засухи. И этим повысить выход дигаплоидных растений (рис. 2.2). Поскольку в мировой литературе не дано определения генетическим факторам, ответственным за процесс элиминации, роль генотипов *H. vulgare* и *H. bulbosum* в данной системе остаётся в центре внимания исследователей. Для изучения роли родительского партнёра нами была проведена гибридизация, для которой были подобраны материнские формы — гибриды (F<sub>2</sub>) *H. vulgare* и клоны *H. bulbosum* — в качестве отцовских форм. Исходя из полученных данных, сделано заключение: частота всех показателей гаплопродукции находится в зависимости как от материнского, так и от отцовского родителя, но чаще от их аддитивного влияния. Подтверждение этому выводу было приведено в работах Pickering et al. и Novak [523, 524].

Проведены эксперименты по получению гаплоидов озимых форм ячменя при скрещивании его с генотипами ржи с целью проверки её гаплопродюсерных способностей (при условии совпадения сроков цветения). Более высокий выход гаплоидов (5,8–26 %) выявлен в комбинациях с рожью Одесская многолетняя при обработке колосьев во время образования гибридных зерновок. Хотя по результативности этот приём уступал варианту с «бульбозум», но удвоенные гаплоиды были получены и переданы для испытаний. Сделан вывод, что этот путь также может быть использован в работе по гаплоидии ячменя, при условии предварительного подбора партнёрских пар. Проведение совершенствование приёма диплоидизации гаплоидов, способствующее 70 %-му выходу дигаплоидов ячменя озимого и ярового типов в данной гаплопродукционной системе, а также применение приёма размножения вегетирующих дигаплоидов через эмбриокультуру с коэффициентом не ниже 1:100 в сезон их получения, позволило достичь удовлетворительного уровня работы по получению гомозиготного материала из гибридов.



Диплоидный колос



Гаплоидный колос



Рис. 2.2. Гаплоидные и диплоидные колосья ярового ячменя до и после колхицинирования, метафазные пластинки корешков гаплоидных и диплоидных растений

На основе проведенных исследований предложена технологическая схема получения гаплоидов и дигаплоидов ячменя (рис. 2.3).

Показана последовательность исполнения этапов процесса гаплопродукции — от тестирования клонов гаплопродюсера, выделения зародышей из зерновок и выращивания до проростков в усло-

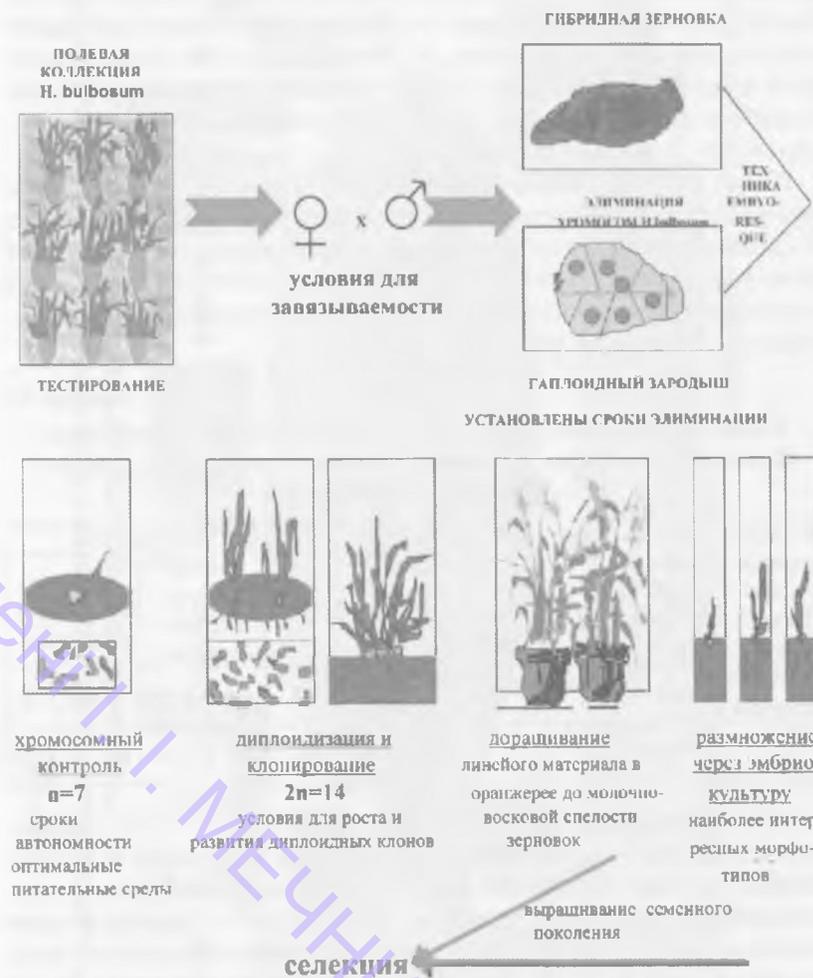


Рис. 2.3. Схема технологического процесса получения гомозиготных линий ячменя при скрещивании с *H. bulbosum*

виях *in vitro*, их диплоидизации, доращивании удвоенных гаплоидов до семян, размножения их в сезон получения и до передачи линий на испытания. Использование этой технологической схемы в научно-практической работе на селекционном материале по нашим методическим рекомендациям (табл. 2.2) выявило, что лучшими для дифференцировки гаплоидных зародышей являются условия фитотрона. Это подтверждено количеством полученных гаплоидных зародышей и их оптимальными размерами, обеспечивающими их жизнеспособность и получение растений. Однако наиболее ценные для селекции в нашей климатической зоне линии были отобраны селекционером, в основном, в полевых условиях.

Работа с популяциями гибридов  $F_2$  и  $F_3$  различной генетической сложности позволила установить, что поколение гибридов и уровень их сложности не влияют на количественный выход гаплоидов и их удвоенных форм. Причины количественных различий, выявленных у гибридов по технологическим показателям, обусловлены лишь исходными формами *H. vulgare*.

Таблица 2.2

Результаты получения удвоенных гаплоидов ярового ячменя с помощью *H. bulbosum* из гибридов, выращенных в разных климатических условиях (в один календарный год)

Условия выращивания гибридов	Количество опыленных цветков	Выделено гаплоидных зародышей, %	Дифференцированные зародыши, %	Получено гаплоидов		
				штук	процент от опыленных цветков	процент удвоенных гаплоидов
Полевые условия	66452	$27,1 \pm 1,45$	$50,2 \pm 1,93$	1175	$1,8 \pm 0,23$	$37,4 \pm 1,36$
Фитотрон	2958	$37,1 \pm 1,09$	$70,5 \pm 0,92$	136	$4,6 \pm 1,39$	$80,9 \pm 1,73$

Таким образом, разработанная биотехнология получения гомозиготного линейного материала ячменя позволяет создавать из его гибридных популяций ценный исходный материал для разных направлений селекции в более короткий срок, по сравнению с традиционными методами. Использование в целевых селекционных программах предложенной нами методики (рис. 2.4 (а)), позволило впервые в нашей стране в 80–90-х годах XX столетия успешно реализовать её в 4 сорта ярового ячменя — Исток, Прерия, Одесский 115 и Степной дар.

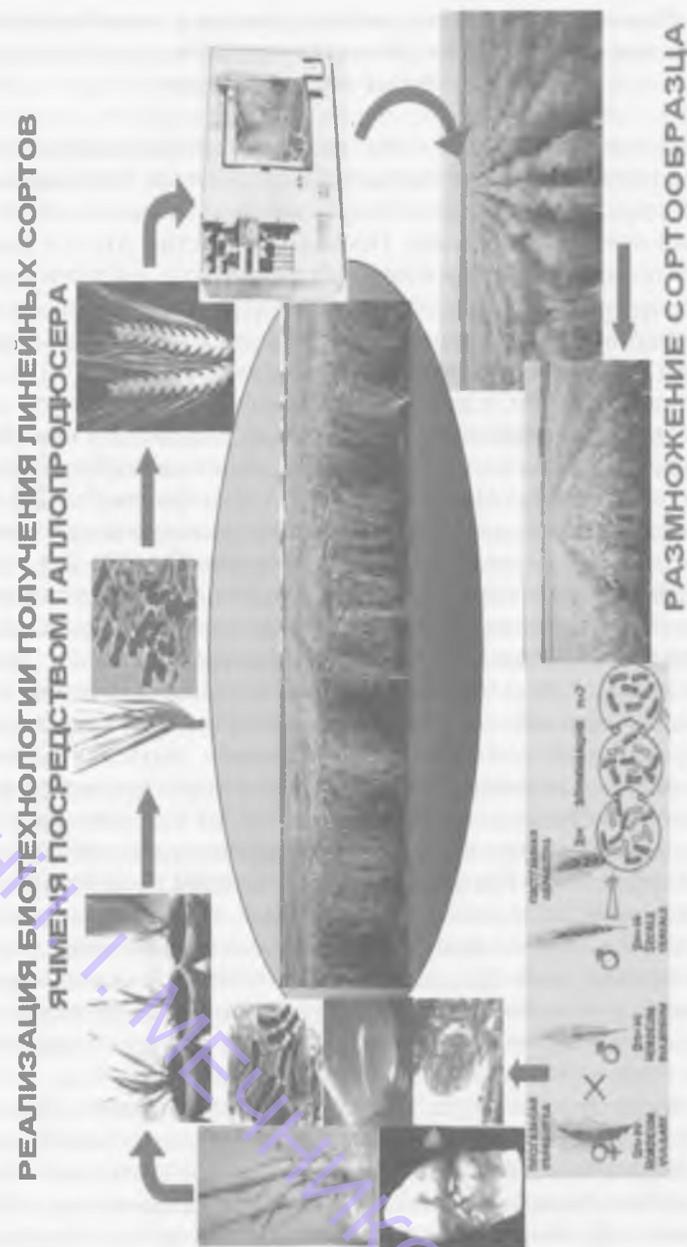


Рис. 2.4 (а)

### 2.1.1.1. Получение отдалённых гибридов ячменя с устойчивостью к абиотическим и биотическим факторам окружающей среды в климатических условиях Одесского региона

Для ячменя, в аспекте обогащения его генофонда такими ценными свойствами, как устойчивость к неблагоприятным факторам окружающей среды, очень перспективным донором считается дикий луковичный ячмень *H. bulbosum*. Поскольку известно, что его формы содержат гены устойчивости к низким температурам и к разным грибным заболеваниям. Однако получение отдалённых гибридов на этой основе связано с проявляющейся несовместимостью и гибелью образующихся гибридных зародышей в зерновках на растениях на разных этапах развития *in vivo*, и затем после их выделения из зерновок уже в процессе роста проростков в условиях *in vitro*. В этой связи нами были разработаны биотехнологические системы получения гибридных растений от скрещиваний *H. vulgare* ( $2n=14$ ) × *H. bulbosum* ( $2n=28$ ). Подобраны оптимальные сроки посева семенного материала культурного вида (гибриды  $F_1$ ) и сроки цветения *H. bulbosum* ( $2n=28$ ). Для гибридизации были использованы 17 его клонов. Наиболее результативным по завязыванию гибридных зерновок в скрещиваниях с яровыми сортами ячменя выделился клон с 29,2 % завязываемости, и с гибридными формами — 57,3 %. В проведенной методической работе было выявлено, что для снятия прогамной несовместимости в парах такого типа скрещиваний можно использовать приём опыления материнской формы охлаждённой пылью. Это позволяет повысить уровень завязывания гибридных зерновок до 124,1–172,2 % (в зависимости от комбинации). При этом количество полученных растений составляло 136,4–170,0 % (от контроля). Больше растений было получено от гибридных зерновок с размерами 2,3–4,2 мм. Питательная среда MS с добавлением 2,4-Д и кинетина способствовала повышению регенерации растений через путь каллусогенеза *in vitro*. От скрещиваний с озимыми формами ячменя получено 52 растения, а с яровыми — 80. Из отдельных комбинаций удалось получить гомозиготные линии, которые были переданы для полевых испытаний [525].

В качестве дополнения к вышеизложенному материалу, была изучена эффективность отдалённых скрещиваний другого типа — проведено 20 комбинаций скрещиваний 10 гибридов культурного ячменя с 7 дикими формами *Hordeum spontaneum*. Процент полученных гибридных зерновок в разных комбинациях колебался в пределах

25 — 68,8 %. Лучшие результаты показаны при гибридизации лишь с отдельными формами *H. spontaneum*, когда образованные при этом гибридные зерновки составляли до 83,3 %. Наблюдали формирование жизнеспособных зерновок с диплоидным набором хромосом без каких-либо нарушений. Линейный материал в данном аспекте работы был получен и передан для дальнейших селекционных испытаний [526].

## 2.2. СОЗДАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЙ ПОЛУЧЕНИЯ РАСТЕНИЙ ОТДАЛЁННЫХ ГИБРИДОВ НА ОСНОВЕ ПШЕНИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ЭМБРИОКУЛЬТУРЫ

Варианты эмбриокультуры для получения гибридных растений от отдалённой гибридизации, в зависимости от цели планируемой работы и участвующих партнёров, могут быть разными [253, 265]. В этой связи совершенствование метода эмбриокультуры, как основы для отдалённой гибридизации пшеницы, не теряет своей актуальности.

Первый прямой, наиболее короткий и давно используемый исследователями путь, ведущий к получению разного типа гибридных растений, реализуется через дорастивание гибридного зародыша после вычленения его из зерновки, образованной после опыления материнской формы, подобранной для этого необходимой отцовской формой.

При получении отдалённых гибридов пшеницы по этому пути (Рис. 2.4 (б)) наше внимание было уделено следующим вопросам: образованию гибридных зерновок, условиям формирования в них зародышей, поиску компонентов питательных сред с учётом требований различных культур в зависимости от степени дифференциации образующихся зародышей и разработке необходимых условий для поддержания жизнеспособности образованных гибридных растений. В результате разработки условий получения гибридных зерновок значительным по сумме положительных эффектов для всех отреагировавших на обработки генотипов перед опылением явилось влияние 0,1 % и 0,5 % ЭАК (эпси-аминокапроновой кислоты) и 200 мг/л пролина. Эффективной для образования гибридной зерновки после опыления явилась обработка раствором 75 мг/л гибберелловой кислоты. Для дорастивания гибридных нормально развитых зародышей подходила разработанная нами питательная среда P8. Для аномаль-

ных и недифференцированных зародышей определены условия культивирования *in vitro*: 2–3 недели в темноте при температуре 26 °С на питательной среде ГБ-5 с добавлением 0,1 мг/л АБК или 1 мг/л парааминобензойной кислоты (ПАБ). Затем, после заметного прорастания, зародыши культивировали на среде Р8 с добавлением 0,5 мг/л ПАБ и доращивали в климатической камере. При этих условиях было получено 270 гибридных растений первичных озимых гексаплоидных тритикале от скрещивания озимой твёрдой пшеницы с озимой диплоидной рожью. Проведено улучшение озимой твёрдой пшеницы посредством скрещивания её (отцовская форма) с вновь созданными первичными гексаплоидными формами тритикале (материнская форма). По всем комбинациям получено 183 растения озимой твёрдой пшеницы и 190 растений тритикале, из которых были отобраны перспективные для селекции формы. Эти условия были использованы также и для получения гибридов от реципрокных скрещиваний сортов и гибридных форм *Triticum aestivum* × Тритикале (первичные и вторичные). Получено и передано для изучения более 150 гибридных растений тритикале. Установлено, что предложенные условия позволяют детерминировать «низкоотзывчивые генотипы», а при подборе для них подходящих обработок можно улучшать выход из них гибридных растений. Так как гибридный материал типа тритикале, полученный разными генетическими путями, также нуждался в стабилизации, предложено в год его получения в условиях искусственного климата проводить культуру пыльников на основе разработанной нами технологии (рис. 1.8). Этим обеспечивалась гомозиготность генотипов в разных комбинациях скрещиваний, а процесс создания гибридов типа тритикале представлял уже мини-биотехнологию (рис. 2.5). С её помощью в срок короче, чем традиционный путь, формы F<sub>1</sub> гибридов можно перевести в стабильный исходный материал. Эти результаты служат доказательством применения данной методики в селекционно-генетической работе по созданию отдалённых гибридов на основе пшеницы. Кроме эмбриокультуры, при доращивании незрелых гибридных зародышей *in vitro* разрабатывался другой путь получения гибридных растений. Это было необходимо при формировании в гибридной зерновке слабо дифференцированных зародышей с низкой жизнеспособностью, как например — от реципрокных скрещиваний пшеницы и ячменя. В этом случае образование гибридных растений проходило через регенерацию полученных из гибридных зародышей соматических тканей или из опыленных завязей

гибридов, поскольку развитие зародышей из них в этом типе скрещиваний, как правило, не происходило. За основу питательной среды была взята среда MS с 1,5–4,0 мг/л 2,4-Д. Интенсивность индукции каллусов зависела от уровня ауксина в среде, а частота их определялась комбинацией гибрида и размерами зародышей. Максимум её у гибридов равнялся 100 % при среднем значении 61,24±19,58 %. Процесс морфогенеза, ориентированный на регенерацию каллусов через органогенез и эмбриоидогенез, проходил в присутствии 0,2 мг/л 2,4-Д в питательной среде с выходом растений до 28,12±2,13 % в среднем по всем комбинациям. Этот путь получения растений был использован для создания гибридов 24 комбинаций озимого гексаплоидного тритикале с сортами и формами озимой твёрдой пшеницы и предназначался для увеличения количества регенерантов и их генетического разнообразия внутри комбинации по типу каждой из родительских форм — по типу тритикале и по типу твёрдой пшеницы.

В результате применения этого пути для получения растений «по типу тритикале», когда в последнем пассаже содержание 2,4-Д довели до 0,4 мг/л, в трёх комбинациях скрещивания удалось добиться значительного улучшения выхода растений (иногда — более чем в 3 раза). Количество гибридных растений типа твёрдой пшеницы увеличилось в 1,5–1,7 раза по сравнению с использованием первого пути. Доказано увеличение генетической изменчивости по признакам продуктивности среди регенерантов. Таким образом, очевидна перспективность использования данного пути для проведения работ с отдалёнными гибридами для усиления генетического разнообразия среди гибридного материала.

По этому пути было проведено получение гибридных регенерантов из незрелых зародышей пшенично-ржаных гибридов — между твёрдой пшеницей и рожью. Этим было достигнуто увеличение выхода полученных форм и их жизнеспособности. Отмечено увеличение генетического разнообразия по различным хозяйственно-ценным признакам у отдалённых гибридов озимой мягкой пшеницы с тремя видами эгилопсов из популяций 3-го, 4-го и 5-го поколений гибридов. Используя условия работы с каллусными культурами и получения регенерантов, получили растения у 18 из 23 генотипов, образовавших каллус. Частота регенерации между генотипами трёх комбинаций колебалась от 0 до 16,67 ± 6,21 % у форм с *A. tauschii*, от 13,33 ± 2,65 до 51,95 ± 5,69 % — у форм с *A. variabilis*, от 1,75 ± 1,74 до 26,67 ± 5,11 — с *A. ventricosa*.

**ПОЛУЧЕНИЕ ОТДАЛЕННЫХ ГИБРИДОВ  
(ИНТРОГРЕССИВНЫХ ФОРМ) НА ОСНОВЕ ПШЕНИЦЫ**



Рис. 2.4 (б)

**схема создания гомозиготных линий тритикале**

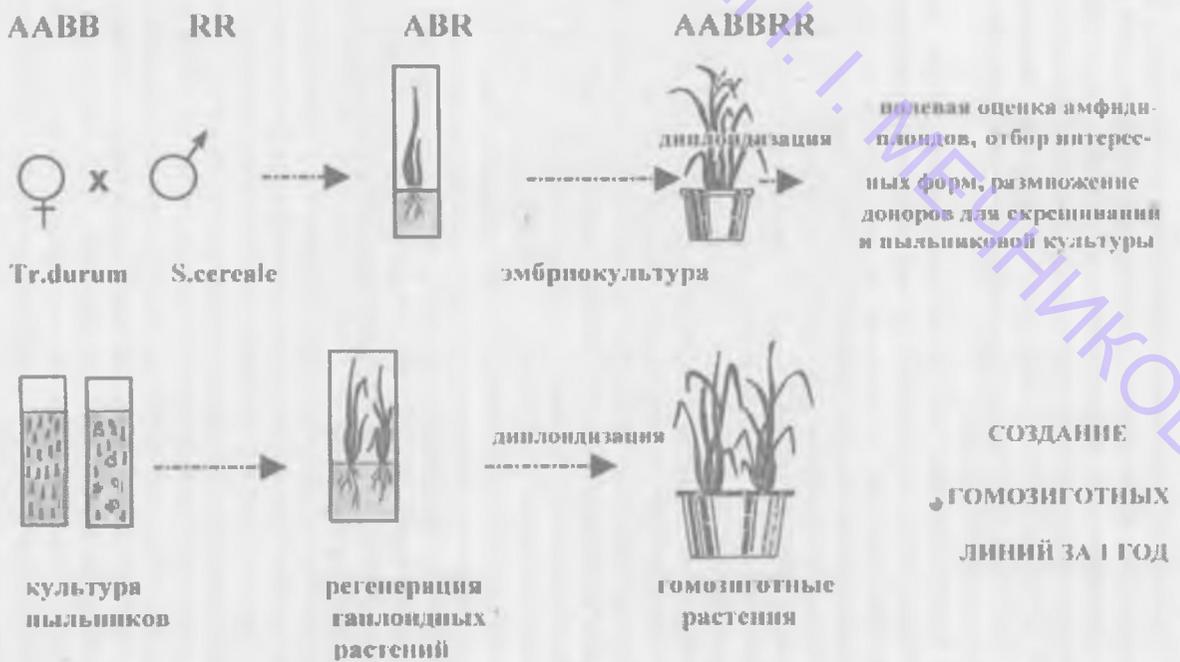


Рис. 2.5

Для ускорения стабилизации полученных регенерантов отдалённых гибридов от скрещивания озимой мягкой пшеницы и эгилопсов была успешно использована разработанная нами система достижения гомозиготности через культуру пыльников. На основании результатов проведенных экспериментов можно считать эту разработку необходимой и вполне осуществимой для целей получения линейного исходного материала из популяций поколений гибридов разного типа на основе пшеницы.

В итоге представленной проведенной нами работы сделано заключение, что её результаты на уровне использования соматической каллусной культуры, полученной из «зародышей» разной степени дифференциации от скрещивания пшеницы с другими злаками, свидетельствуют о широких возможностях этого *in vitro* пути создания отдалённых гибридов, по сравнению с классическим приёмом их получения — прямым дорастиванием гибридных зародышей до растений в условиях *in vitro*. Использование разработанного комплекса условий, включающего набор наиболее благоприятных вариантов обработок для снижения про- и постгамной несовместимости при получении гибридных зерновок, подбор и оптимизацию питательных сред и условий культивирования *in vitro* для гибридных зародышей, а также использование различных биотехнологических путей для достижения регенерации у образующихся «зародышевых структур» разной степени дифференцированности и последующей стабилизации полученных гибридов в гомозиготах через культуру пыльников, позволяет обеспечить приемлемую для селекции результативность процесса отдалённой гибридизации. И на базе разных мини-биотехнологий эффективно создавать новые константные генотипы уникальных гибридных форм растений.

### КЛЕТОЧНЫЕ ПОПУЛЯЦИИ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* — ИСТОЧНИК ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ, РАЗРАБОТКА НА ЭТОЙ ОСНОВЕ БИОТЕХНОЛОГИЙ СОЗДАНИЯ НОВОГО ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ВОЗДЕЛЫВАЕМЫХ ВИДОВ

По мнению исследователей-биотехнологов, фактором, способствующим появлению новых биотехнологий, могут быть и сами активно развивающиеся методы *in vitro*. Успешная реализация клеткой высшего растения присущего ей свойства тотипотентности в настоящее время может быть достигнута эмпирически различными путями — либо через образование в каллусах меристемных зон и развития на их основе зачатков стеблевых апексов, либо — из единичной клетки через развитие в эмбриоидогенезе морфогенетической структуры и затем её прямой регенерации в проросток. Эти пути могут в разной степени быть выражены в культуре *in vitro* у различных видов растений [281]. Но общим правилом при образовании растений обоими путями является выявление среди регенерантов генетического разнообразия [282].

В большинстве случаев показано, что растения, полученные посредством первого пути — через каллусные культуры, характеризовались большей генетической вариабельностью, чем развившиеся из эмбриоидоподобных структур. Прежде всего, вероятно потому, что геномам клеток, интегрированных в структуры (как, например, зиготические зародыши) вариабельность не свойственна. А если и может она в них возникать при культивировании в условиях *in vitro*, то не чаще, чем спонтанные мутации в популяциях растений данного вида [282]. В процессе же индукции каллуса в клеточных популяциях из любого экспланта в условиях *in vitro*, особенно при длительном его культивировании, появляются и накапливаются разного рода генетические изменения [283]. Открытие данного феномена имеет двоякое значение. С одной стороны — оно положительное, поскольку определяет перспективы для разработки биотехнологий создания генетически разнообразного материала для селекции, с другой стороны — является серьёзной проблемой для активно развивающихся

биотехнологий, цель которых в стабильном воспроизводстве копий исходного генотипа. Открытие данного явления представляет интерес для рассмотрения его с различных точек зрения исследователей.

Так, в работе Skirvin [284] о вариациях, возникающих в культуре тканей растений разных видов, сделана попытка классифицировать и сгруппировать отмеченную исследователями изменчивость, представленную в литературе 50–70-х годов XX столетия. А именно: а) физиологические и морфологические изменения в недифференцированных каллусах; б) вариабельность, наблюдаемую при регенерации морфогенетических структур разными путями; в) изменения, обнаруживаемые уже в дифференцированных растениях; г) различные хромосомные изменения. Автор в своей работе отмечает, что феномен вариабельности вездесущ и может проявляться как в условиях *in vivo*, так и *in vitro*. Но так как возникающая *in vivo* изменчивость имеет преимущественно тканевое происхождение и поэтому является по структуре химерной, то, по мнению автора, система, построенная на основе выделения вариаций из отдельных клеток тканей, находящихся в условиях *in vitro* на уровне «чистых мутантных типов», могла бы представлять немалый практический интерес. Потому что таким путём можно было бы быстро получать стабильный материал для использования его в селекции разных культур с целью создания новых уникальных и практически полезных форм. Это впоследствии получило подтверждение в работах автора на декоративных культурах [284]. После появления в 50-х годах данных, свидетельствующих о вариабельности, присущей клеткам, находящимся в условиях *in vitro*, исследования по её изучению на различных видах получают широкое развитие. Так, появились сообщения о выявленной нестабильности в клеточных культурах на кариотипическом, морфологическом, биохимическом и молекулярном уровнях. В 80-х годах в некоторых работах уже был представлен анализ этих результатов и предложены объяснения полученным фактам. Veyliss [285], проанализировав сообщения о появлении хромосомной изменчивости в клеточных культурах, которая была представлена полиплоидными и анеуплоидными клетками, изменениями в структуре и морфологии хромосом, разрывами хромосом, различными нарушениями митотического цикла, пришёл к выводу, что хромосомная нестабильность в культивируемых клеточных популяциях является «скорее правилом, чем исключением». Тогда было выдвинуто предположение, что появление хромосомных аномалий вызвано неорганизованным ростом

клеток вследствие стимулирующего воздействия на этот процесс ауксина 2,4-Д.

В других работах для объяснения возникновения генетической изменчивости в клеточных популяциях приведены предположения о влиянии на её появление возраста донорного растения, генетической гетерогенности исходного экспланта, состава питательной среды и условий выращивания, а также генетической конституции вида и длительности периода культивирования эксплантов, особенно в фазах морфогенеза — дедифференцировки и дифференцировки [286]. Высказано мнение, что при использовании различных соотношений между экзогенными фитогормонами в питательной среде можно достичь получения клеточных линий разных уровней плоидности с разным спектром хромосомных aberrаций. В этом аспекте интересно высказанное авторское мнение, что изменение генетического и/или физиологического гомеостаза растения может явиться одной из главных причин появления геномной изменчивости как таковой, и затем проявиться в её различном выражении [283, 287]. В культурах клеток и тканей, среди субклонов линии одного генотипа, морфологическая изменчивость может быть выявлена по скорости прироста клеточной массы и по типу регенерации (эмбриоидогенез или стеблевой органогенез), консистенции и пигментации каллусной массы, по степени привыкания клеточной культуры к экзогенным гормональным препаратам. Биохимическую изменчивость в клеточных популяциях субклонов различных пассажей можно наблюдать по типам и уровню накопления в них вторичных метаболитов, а также по различным вариациям количественного уровня белковых фракций в суммарном протеине зерна и по их изоферментным спектрам [283]. Другие считают, что появление таких вариантов во многом может определяться влиянием трофических и онтогенетических факторов культивирования, что также может указывать на геномную мобильность изменчивости [330]. Что же касается появления изменчивости на молекулярном уровне, то в культурах тканей можно встретить количественные и качественные изменения в повторяющейся рДНК, а также полиморфизм метилированной ДНК [283] и вариабельность митохондриального генома [288].

Чаще всего генетические изменения в культивируемых клетках наблюдаются в виде изменённого числа хромосом, различных хромосомных aberrаций, точковых мутаций, генных амплификаций, смены положений мобильных диспергированных генов, изменений

внеядерных генов — в пластидном и митохондриальном геномах [289]. Многие из выявленных изменений, накапливающиеся в процессе культивирования клеток и тканей, могут проявиться впоследствии и у регенерированных из них растений.

Исходя из этого, считают, что выявление спонтанных вариаций в длительно культивируемой клеточной популяции может быть использовано для выявления полезных генетических вариантов и прямого получения из них новых генотипов для селекционных целей [290]. Изменчивость, которая выявляется у регенерантов из соматических клеток и тканей любого экспланта, получила название соматической [291], а у регенерантов из клеточной популяции, полученной из гамет, — гаметоклональной. В обоих случаях изменённые варианты могут проявляться только на уровне фенотипа и неся название эпигенетических изменений [290]. Для установления мутационной или модификационной природы изменчивости применяется система проверки, основанная на анализе расщепления изменённого признака в семенном потомстве регенерантов. Такого типа вариабельность была выявлена у регенерантов различных видов, полученных через органогенез или эмбриодогенез различных эксплантов [282, 290, 296]. Для установления генетического характера выявленной изменчивости требуется её подтверждение в полученных половым путём поколениях генотипа-регенеранта.

Первой генетической вариацией изменения уровня хромосом в культуре клеточной популяции, реализованной у регенерантов, было увеличение уровня плоидности, что показано на многих видах растений — *Pelargonium zonale*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana glauca*, *Lycopersicon esculentum*, *Medicago sativa* [290]. Хромосомные перестройки были обнаружены у регенерантов из протопластов картофеля [292]. Среди одного поколения регенерантов томата, полученных из листового каллуса, было выявлено одновременно 13 различных мутантов [290], гены которых были впоследствии локализованы на определённых хромосомах [293]. Цитоплазматические вариации определяются реже, чем генные мутации. Наиболее важной из такого типа генетической изменчивости считают выявление Gengenbach et al. [294] у регенерантов из клеточной культуры кукурузы, цитоплазматически контролируемой (на уровне митохондриальной ДНК) мужской стерильности. Соматическая изменчивость по признаку мужской стерильности, определяемая рецессивной мутацией, была выявлена и у томата [295]. В дополнение к этому, у томата

были выявлены генные мутации, связанные с хлорофиллдефектностью, определяемые на хлоропластной ДНК. А также много других морфологических, отличающихся высокой декоративностью генетически стабильных вариантов было выявлено у петунии [290].

Интерес представляет выявление соматических вариаций у экономически важных возделываемых культур. В этом аспекте следует отметить работы Larkin и Scowcroft [291, 297], в которых приведены первые данные по обнаруженной генетической вариабельности у регенерантов одно- и двудольных культур. В одном из первых экспериментов Edallo et al., 1981 [цит. по 297] среди 77 растений-регенерантов кукурузы была выделена изменчивость по 17 дефектам, определяемым в структуре эндосперма, и различным мутациям проростков. В опыте Mc Coy и Phillips, 1982 [цит. по 291] среди поколений 51 регенеранта кукурузы восемь оказались рецессивными мутантами с изменением у них различных признаков качества зерна, а один — мутантной формой, у которой проявлялся признак, характеризующий увядание вегетативной массы растений до достижения зрелости зерна. Приведены данные по обнаружению вариантов с устойчивостью к токсину гриба *Maydis* [291]. О выявлении стабильных генетических вариантов по другим признакам в поколениях регенерантов кукурузы свидетельствуют данные Lee и Phillips [298], Doigyk [306].

Что касается пшеницы, то показано выявление соматических клонов у мексиканского карликового сорта мягкой пшеницы Yaqui 50E из культуры тканей незрелых зародышей. Среди 142 регенерантов были получены формы, различающиеся по высоте, времени созревания, наличию остей, цвету леммы и зерна, плотности колоса и восковому налёту листьев. Биохимический анализ семян позволил выявить вариацию в электрофоретическом спектре белка глиадин и в индукции синтеза изоферментов  $\alpha$ -амилазы в ответ на обработку экзогенной  $GA_3$ . На австралийских сортах пшеницы выявлена соматическая изменчивость по компонентам урожайности и уборочному индексу. В другом опыте была проведена оценка 256 полученных через соматическую культуру соматических линий 3 австралийских сортов мягкой пшеницы по 12 хозяйственно-ценным признакам. Значительные эффекты, как отрицательный, так и положительный, относительно исходного материала установлены у регенерантов всех сортов для таких признаков, как число семян в колосе, урожай зерна и показатели урожайности. Среди регенерантов одного из сортов (Millewa) выделено 9 линий, превышающих исходный сорт по массе

зерновки, 11 — по содержанию белка, технологическим качествам и уборочному индексу [297, 299]. По результатам выявленной изменчивости у пшеницы данными авторами было сделано следующее заключение: вариабельность охватывает морфологические и биохимические качества, находящиеся под простым и сложным генетическим контролем; один регенерант-сомаклон может отличаться вариабельностью различных признаков, выделяющихся в поколениях; вариация обнаруживается в эуплоидных формах регенерантов и мейотически стабильных соматклонах; мутация влияет на разные признаки и локусы главного гена, которые могут быть расположены на семи гомологичных хромосомах; соматклональные мутанты могут быть рецессивными (ости, цвет зерновки), доминантными (кроющая оболочка зерна, укорочение длины остей) или кодоминантными (глиадины).

К этому можно добавить и другие результаты, полученные на пшенице, которые явно указывают на влияние генотипа на уровень и тип индуцированных изменений у регенерантов. Так, в работе с соматическими тканями из зрелых зародышей трёх сортов пшеницы были получены соматклоны, у которых обнаружены значимые различия, по сравнению с родительскими формами, по высоте стебля, по длине колоса, количеству зёрен в колосе и по их массе. У одного из сортов эти различия были достоверны и между соматклонами [305]. После регенерации из соматических каллусных культур индийского сорта пшеницы CV Ni 917 в течение нескольких поколений у регенерантов наблюдалось появление вариантов по высоте, периоду созревания, числу и размеру зёрен в колосе и общей урожайности. Эти, как оказалось, генетические изменения были стабильными во всех последующих поколениях. У некоторых соматклонов выявлено увеличение урожайности по сравнению с исходным сортом. Авторы высказали мнение, что такого плана работу перспективно проводить на сортах полукарликовых пшениц [307].

Большая вариабельность по некоторым хозяйственным признакам, как в отрицательную (стерильность колоса, снижение урожайности), так и в положительную сторону (увеличенное количество колосьев у растений), была обнаружена в поколениях регенерантов пшеницы сорта Maris Huntsman [308]. Соматклональная изменчивость по признаку опушения листовой пластинки выявлена у регенерантов яровой пшеницы [309]. В опытах с соматическими тканевыми культурами удалось получить соматклоны пшеницы с различными ядерны-

ми доминантными мутациями, которые, по мнению авторов, могли быть индуцированы условиями культивирования [310]. Интересным, на наш взгляд, является результат получения нескольких генетических вариантов с изменениями в функциональной активности первичных фотосинтетических реакций в листьях у двух сортов озимой пшеницы [311]. Имеются работы, в которых выявлена «полезная» изменчивость морфологических признаков растения пшеницы — таких как — увеличенное количество колосков в колосе и удлинённый колос, удлинённый флаговый лист и укороченные ости колоса [312, 313]. Интересным является сообщение канадских исследователей о редко встречающейся генетической изменчивости среди злаковых культур, выявленной у регенерантов из соматической ткани озимой пшеницы сорта Norstar при оценке проростков двух поколений соматклонов на морозоустойчивость [314].

Из результатов работы по соматклональной изменчивости ячменя можно отметить следующее. Работ по этой теме у ячменя значительно меньше, чем на других злаках. Некоторые из авторов считают, что генетическая вариабельность, имеющая место при культивировании каллуса на уровне растений у аутогамных диплоидных видов, по своему проявлению менее значительна [315]. Автор приводит довод, что на нескольких сортах ячменя после регенерации растений из каллусов только в одном растении им был обнаружен aberrантный мейоз, и лишь в одном зерне на растении обнаружены изменения в минорных компонентах спектра гордеиновых белков. Однако в другой работе у регенерантов из соматических тканей ячменя от незрелых зародышей и семян раннего периода развития были выделены варианты по высоте растений, количеству побегов [316], габитусу и темпам роста, по морфологии колоса и размерам ушек листьев [317]. По сообщению Исакова, в результате изучения регенерантов трёх сортов ячменя в течение трёх поколений выделены стабильные формы, имеющие повышенную массу 1000 зёрен, высокую кустистость, укороченную соломину [318]. Имеются данные по получению регенерантов из каллусных культур от незрелых зародышей ячменя с устойчивостью более чем к одному грибному патогену, сохранявшейся в течение двух полевых поколений [319].

В интенсивно проводимых биотехнологических исследованиях на рисе, в районах возделывания этого злака, определённое место занимают работы и по выявлению соматклональной изменчивости. Изучение регенерантов из соматических тканей, взятых из различных ча-

стей растений, позволило получить ряд интересных в биологическом и практическом отношении форм.

О выявленной вариации среди соматклонов риса, полученных из каллуса зародышей, сообщает Ооно [301]. Полученные им варианты, проявили характер мутации, определяемой простым наследованием по нескольким признакам — высоте, устойчивости к засолению почвы и пигментации. Соматклональная вариация по признакам типа и качества зерна у четырёх сортов риса подвидов *Indica* и *Japonica* была выявлена группой китайских исследователей [302]. Среди регенерантов преимущественно выделились варианты по длине зерна, его весу, консистенции крахмального геля и типу зерна. Однако, как отмечают сами авторы, в ранней работе они наблюдали наследуемую изменчивость среди соматических регенерантов и по другим шести количественным признакам — высоте растений, весу зерна, числу продуктивных побегов, времени созревания, числу зёрен в метёлке и степени фертильности растений, дате колошения, числу и весу зёрен, длине метёлки. Другими исследователями выделено изменённое число побегов и из них — фертильных, длина метёлки, содержание хлорофилла в листьях [320], жизнеспособность семян, высота растений, время цветения, число и масса семян [321], размер семян и метёлки, продуктивность, уровень белка в зерне, число побегов.

Необходимо отметить работу по изучению изменчивости у соматклонов сортов риса дальневосточной селекции, представленной Змеевой [323]. В работе отмечено, что в течение ряда воспроизводившихся генераций у регенерантов различных сортов выявлена изменчивость по времени вымётывания метёлки, высоте растений, числу фертильных колосков, массе 1000 зёрен и осыпаемости зерна. Как правило, она сохранялась в поколениях. Однако в отдельных случаях у регенерантов наблюдалось проявление нестабильности уровня индуцированных изменений по таким признакам, как полегаемость и урожайность.

Продолжая примеры выявленной изменчивости у злаков, уместно добавить интересные, на наш взгляд, результаты, полученные на сахарном тростнике. Различными исследователями, в независимо проведенных экспериментах, в результате выявленной ими соматклональной изменчивости у этой культуры были выделены формы, устойчивые к различным фитопатогенам — вирусу Фиджи, возбудителю мучнистой росы (*Sclerospora sacchari*), ржавчине (*Ustilago scitaminea*) и пятнистости (*Helminthosporium sacchari*) [297, 300].

Большое место в работах по выявлению и изучению характера соматклональной изменчивости у регенерантов, полученных из каллусов соматических эксплантов разных видов, отводится представителям семейства паслёновых. Например, проведенные в этом аспекте многочисленные эксперименты на томатах [283]. Показано, что растения, регенерировавшие из листовых эксплантов одного из инбредных сортов, содержали большое число разнообразных мутантов в расщепляющемся потомстве самоопыленных растений-соматклонов. В потомстве этих регенерантов было выделено 13 ядерных мутаций. Мутации явились причиной изменения таких признаков, как рост, строение плодоножки, окраска плодов и растений, мужская стерильность. У трёх регенерантов выявлены доминантные мутации и у одного — рецессивная. На различную мутационную изменчивость, определяемую простым наследованием по морфологии листьев, характеру ветвления, окраске плодов и плодоножки, изменению содержания хлорофилла в листьях у соматических регенерантов томата, указывали и другие авторы [295, 300].

В работе, проведенной японскими исследователями с самоопыленными потомками регенерантов, полученными из листовых каллусов томатов, было отобрано 14 растений, отличавшихся от исходных форм коротким периодом роста, пролонгированным временем цветения, высоким темпом образования плодов и разной степенью сбалансированности у них ростовых процессов [322].

Другой, экономически важной культурой этого же семейства, подвергнувшейся широкому изучению полученных у неё соматклонов, установлению их генетической стабильности и практической ценности, является картофель. Возможность увеличения разнообразия коллекционного сортового материала на основе получения соматклонов из каллусных эксплантов соматических тканей картофеля, по мнению исследователей, может представлять большой интерес для селекции. Независимо друг от друга, различные исследователи в 70-х годах получили успешную регенерацию растений картофеля сорта *Russet Burbank* из мезофильных протопластов листьев и обнаружили у регенерантов широкое разнообразие по морфологическим признакам [303, 304]. После двух сезонов испытаний в полевых условиях статистически значимые различия были найдены по 22 из 35 изученных признаков у 65 отобранных соматклонов, отличавшихся от исходного генотипа. На основании этих данных авторы высказали мнение о возможности улучшения исходного сорта по определён-

ным морфологическим признакам. Оказалось возможным выделить 2 % устойчивых клонов к возбудителю гнили *Phytophthora infestans*. В других работах на картофеле соматоклональная изменчивость была подтверждена получением изменённых растений из каллусов других эксплантов, взятых от сортов — Maris Bard, Bintje, Desire. Здесь же приведены данные по фуражным культурам — люцерне, кормовому растению тропических зон возделывания *Stylosanthes* и овощной культуре — салату латуку, у которых выявленные соматоклоны стали использоваться в селекции как исходный материал на улучшение показателей зелёной массы [297].

Рассмотрев представленные в литературе факты, стабильно сохраняющейся в поколениях соматоклональной изменчивости у регенерантов важнейших растительных культур, необходимо остановиться на некоторых результатах по выявлению гаметоклональной изменчивости у регенерантов, полученных в программах по получению гаплоидов.

Оценка гаметоклонов была впервые представлена китайским исследователем Zeng [324] в работе по получению гаплоидов в культуре пыльников пшеницы и риса. Гаметоклональные варианты были выделены среди регенерантов  $R_0$  и сохраняли стабильность в последующих поколениях. Ооно [321] выделил гаметоклональную вариацию среди гомозиготных диплоидов риса по нескольким признакам — по дате колошения растений, фертильности семян, высоте растений, морфологии и содержанию хлорофилла в листьях. Стабильное наследование изменённых признаков было доказано в поколениях. Генетически стабильную изменчивость в поколениях дигаплоидов риса по многим признакам удалось выявить и другому исследователю [325]. В сообщении Evans et al. было описано, что у регенерантов  $R_0$  из культуры микроспор томатов удалось выделить рецессивные мутации, которые по частоте и спектру отличались от этого типа мутаций, выявленных ранее у соматоклонов [326]. Из культуры пыльников картофеля сорта Pito исследователями Valkonen et al. [327] было выделено среди регенерантов девять рецессивных карликовых, медленно растущих мутантов. На проявление генетически наследуемой изменчивости по признакам урожайности среди удвоенных гаплоидов сорта пшеницы Kitt указывали в своей работе Baenziger et al. [328].

Интересно отметить проведенное Snape et al. [329] изучение гаметоклональной вариации в популяциях второго поколения линий от удвоенных гаплоидов двух сортов ячменя и трёх генотипов пшеницы, полученных при использовании техники «bulbosum». Так, у ячменя

не было выявлено никаких гаметоклональных эффектов. В то время как у двух изучавшихся генотипов пшеницы изменчивость была определена по времени выколашивания, высоте растений и отдельным компонентам урожайности. Причём авторы считают, что по типу и амплитуде варьирования этих признаков выявленная изменчивость была подобна соматоклональной у регенерантов, полученных из соматических тканей от незрелых зародышей, и гаметоклональной — у форм, полученных от регенерантов из культуры пыльников.

В работе на сортах риса дальневосточной селекции Змеевой [323] удалось выявить у дигаплоидных линий статистически достоверные отклонения для разных признаков, по сравнению с исходными сортами. Частота появления вариантных линий, как и в случае соматоклональной изменчивости, полученной у этих сортов, зависела от генотипа донора. Значение признака «высота растений» имело тенденцию к снижению, в различной степени выраженную у каждого из сортов. Признаки, характеризующие продуктивность метёлки, выявили сортоспецифические изменения. У некоторых сортов были выявлены линии с прочным прикреплением зерновки в колоске, у других — линии с удачными сочетаниями других полезных признаков. Диапазон изменчивости у изученных у дигаплоидов признаков был значительно шире, чем в популяции контрольных растений, что явно указывает на присутствие гаметоклональной изменчивости в популяциях дигаплоидов. По мнению автора, если она будет проявляться стабильно, то может явиться источником новых исходных форм риса [290].

Приведённые примеры двух типов изменчивости, определяемой на уровне растений, характеризуются подобием выявленных по отдельным признакам вариантов. Однако система получения изменённых вариантов через гаметоклоны, по мнению исследователей, отличается от соматоклональной по трём генетическим критериям. А именно — как доминантные, так и рецессивные мутанты, индуцированные при гаметоклональной вариации, будут сразу экспрессироваться в гаплоидных растениях ( $R_0$ ), в которых присутствует одиночная копия каждого гена. Регенеранты-гаметоклоны могут быть идентифицированы как новые варианты после прохождения у гаплоидных регенерантов диплоидизации. Рекомбинанты, выявленные авторами в экспериментах, могут быть и результатом мейотического кроссинговера. Но так как для практического использования гаплоидных гаметоклонов их хромосомные числа удваивают чаще всего колхицином, который, как известно, индуцирует мутации, то

среди удвоенных гаплоидных гаметоклонов после воздействия кол-лицина появляется вероятность возникновения мутантных форм, отличающихся нестабильностью. И в результате спектр мутаций, полученный через гаметоклональную изменчивость, ещё и по этой причине может отличаться от спектра изменений, полученных посредством соматклональной изменчивости [327].

В свою очередь, если судить о преимуществах и недостатках соматклональной изменчивости с точки зрения использования её для селекции, то, исходя из имеющихся данных [289, 290, 327], по этим двум категориям оценки можно отметить следующее. По первой категории — изменения могут появиться в практически важных признаках и с высокой частотой. Кроме того, некоторые из них могут быть довольно редкими — традиционной селекцией их получить не удаётся. В этом аспекте высказано мнение, что моногенные мутации и мутации генов органелл, которые могут быть получены посредством соматклональной изменчивости, представляют для исследователей возможность введения в работу лучших, подходящих для клеточной культуры сортов с целью последующего отбора среди регенерантов-соматклонов лучших форм для селекции по конкретному признаку. Получая таким путём варианты с присущими сорту необходимыми качествами и при добавлении ещё других необходимых признаков, например, устойчивости к болезням или устойчивости к гербициду, можно добиться значительного улучшения желаемого материала за короткий период времени. Это будет сравнительно дешевле, чем при использовании традиционных методов, особенно у видов, у которых лимитирована генетическая база изменчивости. Вследствие появления генетической изменчивости в клетках и тканях культивируемых эксплантов в виде различных хромосомных перестроек и рекомбинаций, аргументированный интерес к её использованию появился в аспекте интрогрессии чужеродных генов при половой гибридизации (при использовании гибридных зародышей для получения регенерантов) и соматической (через слияние протопластов родительских форм для получения асимметричных гибридов). Первые шаги на различных видах в этих направлениях уже сделаны, полученные в результате растения включены в полевые исследования [289, 330].

Из недостатков соматклональной изменчивости называют непредсказуемость процесса её получения и невозможность предвидения её природы (генетическая или эпигенетическая). Появление нестабильности в поколениях соматклонов, как это имеет место в случае изме-

нений эпигенетической природы, требует дополнительного проведения разностороннего полевого тестирования полученных форм, что затрудняет их получение и увеличивает стоимость. Недостатком считается в ряде случаев отмеченное появление отрицательных признаков, которые нежелательны для селекционного материала. К категории недостатков можно отнести вопрос о невозможности контроля над соматклональной вариацией и то, как сделать её прогнозируемой и направленной, чтобы было возможно её использовать для улучшения растений. Тем не менее, доказано, что соматклональная вариация может стать полезной для селекции, когда полученные соматклоны являются генетически стабильными формами и выявленные изменения наследуются в поколениях.

Необходимо заметить, что актуальным на протяжении многих лет остаётся вопрос о том, можно ли всё-таки использовать соматклональную изменчивость для улучшения агрономически важных полигенных признаков конкретного вида.

Первый успешный результат в этом аспекте был получен в Индии в 1995 году на горчице, в котором была показана возможность совмещения признаков высокой урожайности и полигенной устойчивости у растений [326]. К настоящему времени продемонстрированы примеры реализации выявленной соматклональной изменчивости у растений различных возделываемых видов в 24 сорта [289]. Среди них — высокоурожайный сорт пшеницы, сорт зерновой кукурузы и сорт кукурузы на зелёную массу, полученные в Китае. А также — три сорта риса — один с устойчивостью к пирикулярриозу и с улучшенными технологическими качествами — созданный в Венгрии, второй — с повышенной толерантностью к затоплению — созданный в Австралии, и третий — с устойчивостью к гнилям зерна, созданный в странах Среднего Востока. Методом отбора форм из соматклональных вариантов в Краснодарском институте риса (Россия) создан сорт риса Биориза, сочетающий скороспелость, длиннозёрность и продуктивность, которые до этого не удавалось совместить в одном генотипе этого злака традиционными методами селекции [331].

Кроме сообщения о созданных сортах злаков, в указанной работе [289] приведены данные по созданию в разных странах на основе соматклонов — 3 сорта петрушки с устойчивостью к фузариозу; 2 сорта томата с устойчивостью к фузариозу и засолению; продуктивного сорта картофеля; двух сортов сладкого перца, отличающихся окраской, высокой урожайностью и ускоренным созреванием; сорта

банана, устойчивого к фузариозу; высокоурожайного сорта капусты — и нескольких сортов декоративных травянистых и цветочных культур. Хотя биотехнологически успешные результаты пока ещё не столь значительны в количественном отношении, но их получение побуждает исследователей к поиску путей увеличения эффективности работы в данном направлении.

С целью увеличения частоты искомой генетической изменчивости среди регенерантов, получаемых из соматических и генеративных эксплантов, в 80-х годах было предложено проводить селекцию *in vitro* на разных эксплантах от разных растений и образующихся на их основе морфогенетических структурах. В опытах моделировали воздействие разных факторов окружающей среды и использовали различные селективные агенты для отбора на их фоне форм с признаками устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам [332]. За прошедший период эта техника получила широкое развитие и уже позволяет выделять из клеточных популяций варианты по отдельным признакам, наличие которых можно определить в растениях, лишь изучая поколения регенерантов в течение нескольких лет.

С использованием различных приёмов селекции *in vitro* были получены интересные данные на разных культурах в таких её направлениях, как резистентность к фитопатогенам и гербицидам, абиотическим стрессам, вызываемым ионами алюминия, цинка и магния, различными солями, засухой, низкими положительными и отрицательными температурами.

В частности, по признаку устойчивости к фитопатогенам удалось отобрать в условиях стерильной культуры устойчивые к возбудителям фузариевых грибов растения ячменя — к *Fusarium* spp. [333], тритикале — к *Fusarium head blight* [334], пшеницы — к *Helminthosporium sativum* и *Septoria nodorum* [335, 336], сахарного тростника — к *Eyespot*, риса — к *Helminthosporium oryzae* [цит. по 337]. Среди фуражных культур удалось выделить растения люцерны, устойчивые к *Fusarium oxysporum* spp. *Medicagins* [338], среди овощных — томата — к *Clavibacter michiganense* [339], картофеля — к *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora infestans*, *Alternaria solani* [340, 341]. Среди отобранных растений, устойчивых к гербицидам, можно назвать пшеницу с устойчивостью к атразину, дифензоквату, пиклораму [342], кукурузу и ячмень — к глифосату [343, 344]. Также удалось получить устойчивые растения сахарной свёклы и табака к хлорсульфурону, капусты — к атразину и фенмедифаму [340].

Устойчивость к абиотическим стрессам, а именно к алюминию, проявили злаки — рис, кукуруза и пшеница в опытах Jap et al. и Sibov et al. [345, 346]. С устойчивостью к NaCl были выделены растения из регенерантов риса, пшеницы, люцерны [347]; табака, томата и картофеля [333, 348, 349]. Что же касается температурных стрессов, то успешно завершились эксперименты на просе при отборе его форм, устойчивых к засухе, на пшенице — при отборе на морозостойкость, на кукурузе, рисе, красном клевере — при отборе на устойчивость к низким положительным температурам [333, 350, 351].

Другим возможным путём увеличения генетической изменчивости у регенерантов, получаемых в культуре *in vitro*, может явиться мутагенез — с использованием физических и химических факторов. Первые работы по применению методов *in vitro* в комбинации с мутагенезом, например, вызываемым гамма-облучением, позволили получить из соматических тканей кукурузы регенеранты с изменённой окраской листьев и аномальной морфологией отдельных органов. В расщепляющемся поколении этих растений значительные изменения были отмечены лишь в их количественных признаках, таких как высота растений и элементы продуктивности [352]. В другой работе низкие дозы этого же типа облучения в сочетании с техникой *in vitro* способствовали увеличению частоты возникновения вариаций в потомстве риса по длине зерна и его весу, а также по уровню содержания в нём белка и плотности образуемого крахмального геля [353].

Использование гамма-излучения для обработки каллусов из незрелых зародышей ячменя с целью получения Al-выносливых форм позволило выделить два растения, устойчивых к высокой концентрации алюминия, способных расти на загрязнённых им кислых почвах [354]. Усиление вариабельности в культивируемых клетках каллусов кукурузы было получено при обработке соматических клеточных культур этилметансульфанатом, азидом натрия, лучами рентгена и ультрафиолетовым светом. В отдельных экспериментах удалось достичь более чем 5-кратное увеличение изменчивости по таким признакам, как толерантность к низким температурам и гербицидам, жизнеспособность и срок созревания [355].

Приведёнными выше данными не исчерпываются результаты по выявлению генетической изменчивости в условиях *in vitro*, расширению возможностей и совершенствованию методов её усиления у экономически ценных видов растений. С каждым годом увеличивается число позитивных результатов по получению изменённых мутантных

форм культурных растений с важными для селекции признаками. Работы продолжаются на уровне привлечения новых идей и методик [356, 357]. Высказаны мнения, что более результативным при дальнейшей разработке технологичности и удешевлении может явиться генно-инженерный путь достижения генетической изменчивости в тканях растительного организма по признакам, имеющим практическое значение [358]. Что, возможно, уже в ближайшем будущем может повлечь пересмотр многих подходов, которые обсуждаются сегодня. Но в настоящее время работы по выявлению и увеличению соматклональной и гаметоклональной изменчивости активно проводятся на разных растительных культурах в рамках различных проектов, поскольку существует большой научный интерес исследователей к этой проблеме [359, 360, 361, 362].

Таким образом, показанные в работе пока ещё немногочисленные примеры полученных растений с соматклональной и гаметоклональной изменчивостью, реализованные в исходный материал и новые сорта разных видов, демонстрируют большой потенциал биотехнологии на уровне техники культивирования соматических и генеративных клеток и тканей *in vitro*. Эти результаты уже могут служить обоснованием перспективности данной работы как возможного пути создания ядерной и цитоплазматической изменчивости, которую можно использовать в комбинации с селекцией *in vitro* и мутагенезом для ускоренного выведения новых сортов.

На вопрос, что является первопричиной появления изменчивости клеток в популяциях и различных нарушений в иерархии клеточной упорядоченности, приводящей к потере генетической стабильности в геноме, имеются разные гипотезы и предположения. В этой связи интересно отметить существующее мнение о наличии «горячих точек» или гипервариабельности ДНК в геноме растений, которые могут вызывать соматическую рекомбинацию, которая по существу является генетической вариацией. Для её идентификации, по мнению исследователей, необходимо создавать системы молекулярных маркеров, начиная с ранних стадий развития конкретного исходного генотипа растений [289]. И это лишь одно из положений, по которому активно ведутся научные изыскания. Исследователи считают, что поиск молекулярных механизмов регуляции морфогенетических программ развития — от клетки к растению — может стать ключом для открытия нового пути к познанию природы их изменчивости.

### 3.1. РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ *IN VITRO* ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ ФОРМ ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ, ОТЛИЧАЮЩИХСЯ ПОВЫШЕННЫМ УРОВНЕМ УСТОЙЧИВОСТИ К ХЛОРИДУ НАТРИЯ

Создание форм ячменя с повышенным уровнем солеустойчивости представляет селекционный интерес с нескольких точек зрения. Прежде всего, наличие данной генетической способности или свойства необходимо этой одной из важных культур для возделывания её в зонах выращивания, где засоление пахотной земли произошло вследствие применявшегося в течение длительного времени искусственного орошения. Кроме этого, необходимость в увеличении солеустойчивости этого вида растений возрастает и при производственном возделывании его в тех местах, где часто встречаются низины, и в почве в зоне корнеобитания растений образуются слои скопления соле-содержащих грунтовых вод, отличающиеся содержанием сульфатов и карбонатов. Но основными ионами, содержащимися в почве при этих типах засоления, являются катионы натрия и анионы хлора.

Наличие генетического контроля признака солеустойчивости у высших растений в настоящее время доказано для риса, ржи, пшеницы и ячменя [639, 640]. При этом преобладающим мнением учёных о генетической природе этого признака является мнение, что он является полигенным и контролируется, например, у ячменя — не менее чем тремя парами неаллельных генов [641]. В такой ситуации выделить солетолерантные растения методом классической селекции очень сложно, и потому полученные в этом направлении данные в литературе незначительны. Нам удалось их найти — лишь по томатам и рису [642, 643, 644]. Предложены экспериментальные пути повышения солестойкости или солетолерантности растений на уровне повышения их физиологической адаптации к осмотическому стрессу под воздействием различных соединений. И, как полагают исследователи, они, скорее всего, основаны на одновременной стимуляции разных физиологических механизмов, определяющих и составляющих свойство солетолерантности [645, 646, 647]. Однако его повышение можно достигнуть лишь в незначительных пределах, и сохраняется оно на этом уровне лишь непродолжительный период времени. Хотя описаны факты и значительного усиления данного свойства у растений в нескольких полученных поколениях в условиях выращивания на засоленных почвах. Однако данных о генетическом контроле проявляющейся солеустойчивости не приведено [648].

Биотехнология предлагает нетрадиционный путь создания солеустойчивых форм — через индукцию генетической изменчивости в клеточных популяциях при культивировании их *in vitro* и последующий отбор клеточных вариантов, устойчивых к действию солей, обладающих повышенным генетически обусловленным данным свойством. Описанные в литературе биотехнологические системы получения солестойких форм растений в своём большинстве базируются на соматоклональной изменчивости [649, 650, 651]. Это и дало нам основания для проведения исследований на ячмене в данном направлении.

При разработке условий для регенерации каллусного материала, полученного из незрелых зародышей ячменя, в наших экспериментах была исследована возможность получения соматоклональной изменчивости у трёх коллекционных сортов — НЕ 3639, Муромец и Паллидум 731. Среди них наибольшей изменчивостью, выявленной по пяти признакам продуктивности, достоверно подтвердившейся в двух поколениях, выделился сорт Муромец. Были выделены растения этого сорта с достоверным превышением и снижением значения признаков, по сравнению с исходной формой.

В результате эксперимента у сорта ячменя НЕ 3639 выявлено только два изменённых параметра структуры урожая, имевших достоверное превышение, а у сорта Паллидум 731 изменчивости по изучавшимся признакам не было выявлено.

Эти результаты показали необходимость в продолжении работы по получению соматоклональной изменчивости у двух других сортов ячменя с хорошей отзывчивостью на условия *in vitro* и сорте Паллидум 731. Интерес представляло проведение культивирования каллусов из незрелых зародышей разных сортов ячменя через разработанную нами систему (рис. 3.2) на фоне NaCl в качестве селективного агента с целью отбора из популяций его клеток наиболее устойчивых к этому фактору, и получение из них толерантных растений-регенерантов.

Генотипические различия у сортов были определены по интенсивности прорастания их семян (% проросших от общего количества испытанных) при концентрации 2–2,5 % NaCl, которая явилась сублетальной. Первичную каллусную культуру из незрелых зародышей отобранных генотипов подвергали воздействию NaCl по определённой схеме. У трёх испытанных генотипов регенеранты из каллусов, прошедших этапы процесса селекции *in vitro* на фоне данного селективного агента в первом цикле, выращивали до получения семян. И только растения из сорта Паллидум 731 внешне отличались луч-

шим габитусом, и на них не было следов депрессии от воздействия соли. Поэтому незрелые зародыши из регенерантов этого сорта ещё раз подверглись воздействию солевого фактора по представленной схеме. Семена регенерантов из второго цикла селекции высевались до четвёртого поколения. Как видно из диаграммы (рис. 3.1), семена регенерантов четвёртого поколения сорта Паллидум 731(SS») из дважды проведенных через систему культивирования каллусов на средах с селективным агентом отличались более высоким уровнем прорастания семян на растворе с высокой концентрацией NaCl, по сравнению с этим показателем других использованных генотипов [613]. При изучении в полевых условиях показателей структуры урожая у растений-регенерантов сорта Паллидум 731, прошедших один (S») и два цикла (S») отбора в данной селективной системе — длина главного и бокового колосьев, число и масса зёрен, была установлена достоверность их превосходства в сравнении с этими же показателями регенерантов, прошедших только один цикл отбора.

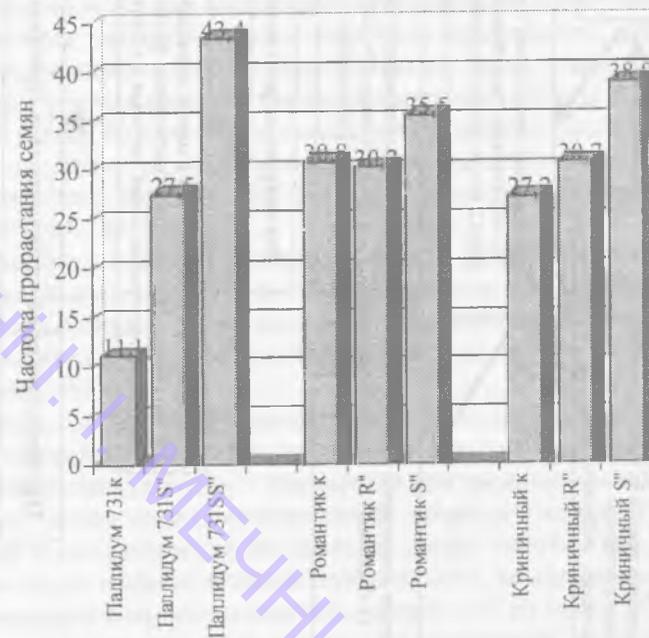


Рис. 3.1. Воздействие 2,5 % NaCl на прорастание семян регенерантов, полученных из каллусов, подвергавшихся воздействию NaCl в двух циклах отбора

## СХЕМА СЕЛЕКЦИИ IN VITRO ЯЧМЕНА НА СОЛЕУСТОЙЧИВОСТЬ

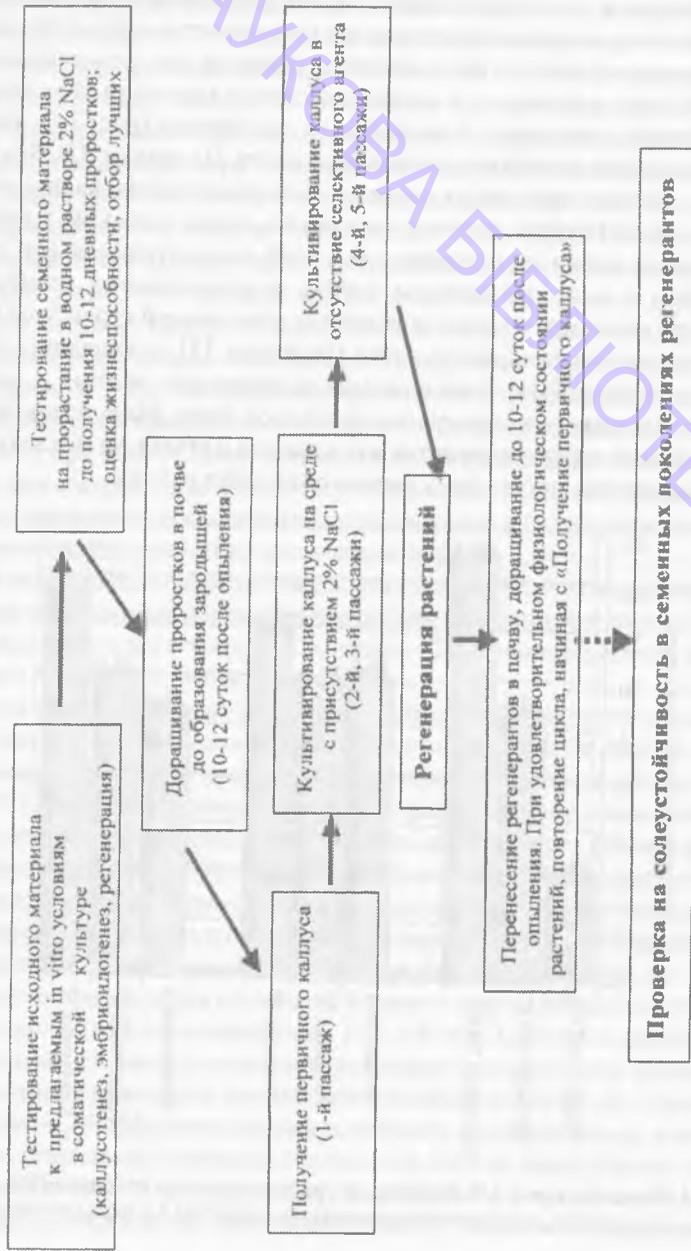


Рис. 3.2

Исходя из этого сделан вывод, что разработанная система отбора на солеустойчивость к NaCl (рис. 3.2) функционирует у ярового ячменя в направлении улучшения данного свойства, что и было показано на примере сорта Паллидум 731. Оценка выделенных форм, появившихся в результате соматической изменчивости, выявила достоверное увеличение у них солеустойчивости, в сравнении с исходными сортами и регенерантами, полученными в отсутствие воздействия селективного агента [661, 662]. Это позволило нам представить данный полученный материал для испытаний и селекционного изучения.

### 3.2. РАЗРАБОТКА ПРИНЦИПОВ СЕЛЕКЦИИ *IN VITRO* ЛЮЦЕРНЫ НА ФУЗАРИОЗУСТОЙЧИВОСТЬ НА ОСНОВЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЕЁ СОМАТИЧЕСКИХ ЭКСПЛАНТОВ В СЕЛЕКТИВНЫХ УСЛОВИЯХ

Создание и оценка селекционного материала, устойчивого к фитопатогенам, традиционными методами представляет длительный процесс, длящийся иногда десятилетиями. В этой связи в разных странах получили развитие биотехнологические работы по созданию систем отбора из клеточных популяций культурных растений форм с устойчивостью к разным наиболее опасным возбудителям грибных болезней [663, 674, 675, 692], а также конкретно, из рода *Fusarium* [678, 679, 690, 691].

Нами была поставлена первая задача — разработать вариант эффективной системы *in vitro* для работы с генотипами сортов люцерны одесской селекции с целью использования её в дальнейшем в практической работе на фузариозоустойчивость этой ценной бобовой культуры [680, 681].

Опыты с люцерной трёх сортов проводили по ступенчатой системе селекции (рис. 3.3) на уровне различных эксплантов и воздействия трёх селективных агентов — фильтрата культуральной жидкости гриба *Fusarium oxysporum* и коммерческих фузариевых токсинов Т-2 и НТ.

При технологической реализации схемы работы (рис. 3.4) поэтапно было изучено влияние сублетальных концентраций селективных агентов на рост и развитие проростков из семян, а также на морфогенез при культивировании изолированных меристем, каллусной ткани различного происхождения и суспензионной культуре. Критерием отбора в первой серии опытов была фитотоксическая

активность фильтрата культуральной жидкости гриба *F. oxysporum*, которая испытывалась на сортах люцерны Комета, Смуглянка и Зайкевича Одесская, различающихся по устойчивости к фузариозу, вызываемому данным патогеном. По данным селекции наиболее устойчивым был сорт Комета, и самый низкий уровень устойчивости — у сорта Зайкевича Одесская. При воздействии в условиях *in vitro* на семена этих сортов эффекты от действия ФКЖ определялись его концентрацией, и наиболее выразительным и адекватным селекционной оценке было распределение сортов при воздействии 5–10 % концентрации культурального фильтрата гриба на 21 сутки после их прорастания.

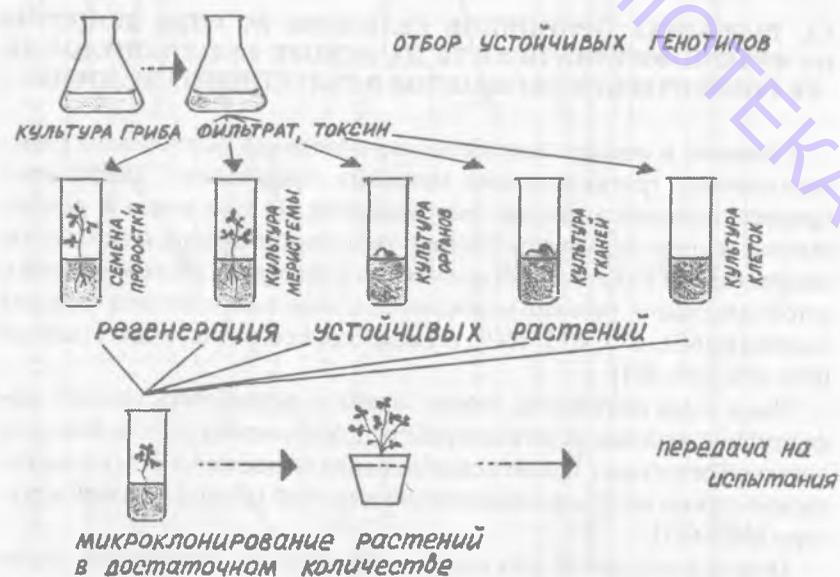


Рис. 3.3. Схема селекции *in vitro* на фузариозоустойчивость люцерны

Сила воздействия токсинов на проростки была такой же, как и у фильтрата, причём токсин Т-2 обладал более сильным токсическим эффектом при концентрации 0,5–1,5 мкМ. В этом опыте определялся самый простой приём скрининга сортовой популяции, когда можно было получить дифференциацию растительного материала люцерны по устойчивости к селективным агентам на уровне проростков. И для дальнейшей работы выбрать лучшие генотипы для

последующего отбора из них эксплантов с толерантной реакцией на селективные агенты.

Во втором цикле для отбора устойчивых растений, исходя из оценки воздействия селективных агентов на регенерацию меристемных эксплантов и выбор из них после 14-дневного культивирования жизнеспособных растений, установлены оптимальные концентрации ФКЖ — 7,5 %, и токсинов — 1 мкМ. Выявленная реакция сортов люцерны на рост меристемных эксплантов при воздействии селективных агентов была адекватна по направленности, определённой ранее на проростках, полученных из семян, и соответствовала исходной расстановке сортов по оценке устойчивости к патогену.

Повторное воздействие увеличенной концентрацией ФКЖ — 10–12 % и токсином в дозе 2 мкМ на изолированные апикальные и пазушные меристемы, выделенные из отобранных в первом цикле растений, позволило провести отбор образцов с повышенной толерантностью к селективным агентам, и затем — к патогену, с одновременным клонированием лучших из них. Этот приём можно было использовать как самостоятельный для предварительной оценки селекционного материала люцерны на устойчивость к грибному патогену *F. oxysporum*. При создании клеточных линий из каллусов, полученных от разных эксплантов на фоне селективных агентов, токсические эффекты были определены для каллусов из корней всех сортов. Слабым оказалось воздействие селективных агентов на каллусы из завязей. Выявленные сортовые различия по воздействию селективных агентов позволили выделить преимущество по устойчивости каллусных культур из завязей сорта Комета. Устойчивые к селективным агентам каллусные линии были созданы из всех сортов. Самый высокий процент встречаемости устойчивых каллусов после двух циклов отбора выявлен у сорта Комета, как на культуральном фильтрате, так и на токсинах.

В результате воздействия на каллусы сублетальными концентрациями селективных агентов созданы 34 устойчивые клеточные линии: 14 линий сорта Комета, 12 линий сорта Смуглянка, 8 линий сорта Зайкевича Одесская, что составило менее 1 % от числа исследованных каллусов. Отобранные линии стабильно сохраняли устойчивость к селективным агентам в течение нескольких месяцев после снятия их селективного давления. Из них были получены регенеранты, которые тестировались на устойчивость к патогену. Часть каллусов была использована для получения суспензионной культуры.

### СХЕМА СЕЛЕКЦИИ IN VITRO НА УСТОЙЧИВОСТЬ ЛЮЦЕРНЫ К ФУЗАРИОЗУ

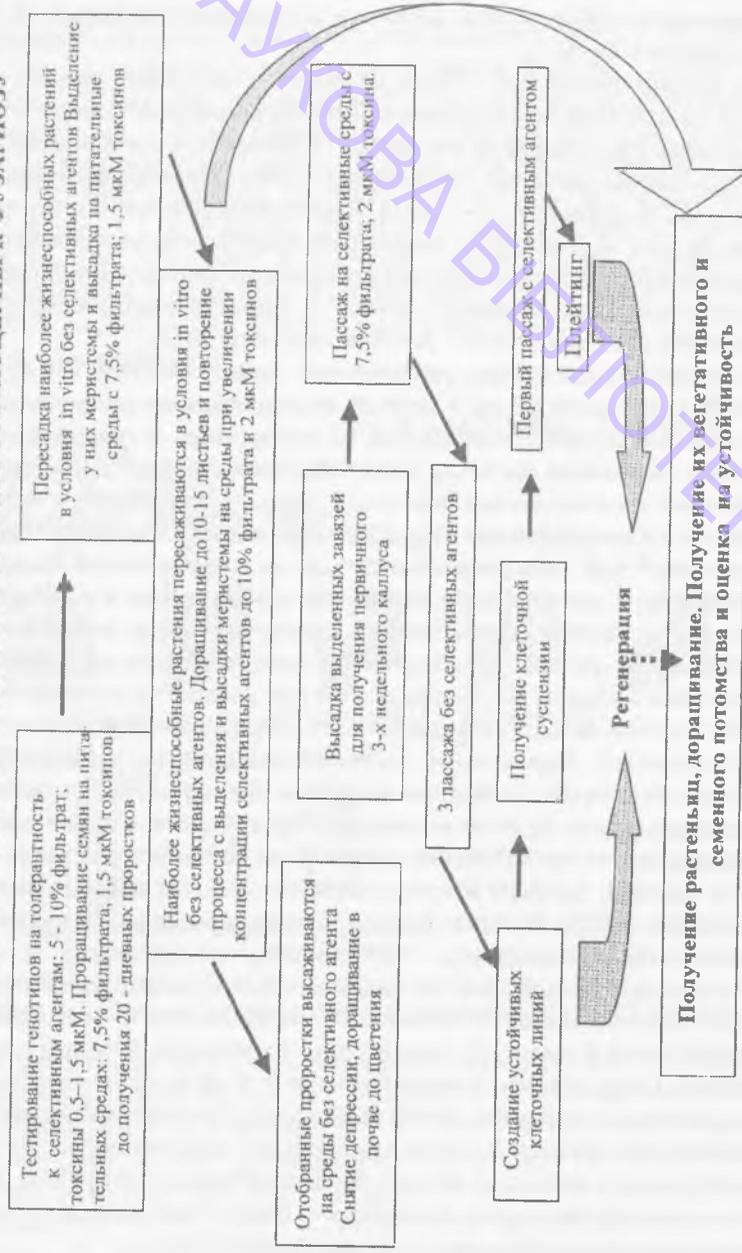


Рис. 3.4

Оптимальными для отбора в суспензионной культуре были следующие концентрации селективных агентов: для ФКЖ 5–6 %, для токсинов 0,5–1,0 мкМ. Выявлено, что клеточные суспензии обладали наибольшей чувствительностью к воздействию селективных агентов. Характер чувствительности по сортам сохранился. Чётко выраженное ингибирование жизнеспособности клеток наблюдалось у сорта Зайкевича Одесская. Самую высокую частоту встречаемости клеток по устойчивости к ФКЖ наблюдали у сорта Комета. Такая же тенденция отмечена и на токсине Т-2, однако уровень встречаемости устойчивых клеток при воздействии этого агента был вдвое ниже. После плейтинга из клеточных культур было получено 150 регенерантов, которые тестировали на устойчивость к патогену. При изучении адекватности проявления признака устойчивости к селективным агентам и патогену было выявлено, что среди 289 растений, полученных из клеточного материала и прошедших отбор, 72 проявили устойчивую реакцию к грибу *F. oxysporum*. Этот факт подтвердился в двух поколениях — вегетативном и семенном. После оценки соматических регенерантов, полученных из клеточных культур, не подвергавшихся воздействию отбора по схеме, было выделено 36 растений-сомаклонов всех сортов, проявивших устойчивость к патогену. Технология процесса отбора представлена на схеме (рис. 3.4).

Таким образом, полученные результаты показали, что разработана принципиально новая биотехнологическая система ступенчатой селекции люцерны на фузариозоустойчивость к грибному возбудителю *F. oxysporum*, проходящая поэтапно на разных эксплантах на фоне трёх селективных агентов (ФКЖ *F. oxysporium* и двух неспецифических коммерческих токсинов грибов из рода *Fusarium*). Данная система *in vitro* может быть использована для отбора из сортовой популяции форм, отличающихся разной степенью устойчивости к указанному патогену, а также — для отбора устойчивых форм из соматклонов, образовавшихся в клеточных популяциях люцерны при культивировании разных её эксплантов [683, 686]. Это явилось основанием для того, чтобы рекомендовать данную биотехнологическую систему для применения в селекционных целях при создании исходного материала люцерны с устойчивостью к сапрофитному грибному патогену *F. oxysporum* (рис. 3.5).



Рис. 3.5. Исполнение этапов селекции *in vitro* к *F. oxysporum* на каллусах из завязей люцерны сорта Смуглянка

### 3.3. МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ДЛЯ РАЗРАБОТКИ СИСТЕМ ОТБОРА ФОРМ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ И ЯЧМЕНЯ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ГРИБНЫМ ПАТОГЕНАМ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

После решения задачи по созданию биотехнологической системы *in vitro*, направленной на отбор фузариозоустойчивых форм люцерны к грибному патогену *F. oxysporum* на уровне разных эксплантов, научный интерес представляла разработка эффективного варианта системы *in vitro* для прогнозирования толерантности мягкой пшеницы к фузариозу колоса, вызываемого *F. graminearum*, и проведения затем отбора устойчивых к этому патогену форм в условиях *in vitro*.

Разработка биотехнологий ускоренного создания исходного материала злаков, и в частности пшеницы, с устойчивостью к болезням, вызываемым грибными патогенами, представляет интерес для селекционно-генетической работы в разных странах [674, 675, 692, 693], и не менее актуален этот вопрос и в Украине [688, 670, 671].

Методология селекции эксплантов злаков в системах *in vitro* на толерантность к такой болезни, как фузариоз колоса, направлена как на методическое совершенствование используемых приёмов *in vitro*, так и на создание оптимальных условий для их функционирования в комплексе с фитопатологическими инструментами, выполняющими роль селективных факторов, — фильтрами культуральной жидкости (ФКЖ) гриба *F. graminearum* [624].

Целью данной работы являлось: изучение морфогенетических особенностей разных эксплантов озимой мягкой пшеницы в условиях *in vitro* при воздействии на них ФКЖ двух контрастных по патогенности штаммов гриба *F. graminearum* (полученных после их культивирования на среде Чапека) для выявления соответствия толерантности эксплантов растений уровню устойчивости их растений-доноров. Это было необходимо для создания биотехнологической системы прогнозирования уровня резистентности к патогену в сортовых и гибридных популяциях мягкой пшеницы, а также для отбора из этих популяций лучших по данному признаку генотипов.

Биотехнологическая работа *in vitro* была начата нами с разработки методики предварительной оценки селекционного материала мягкой пшеницы к фузариозу колоса, вызываемого данным патогеном в период созревания зерна в колосе до полной его спелости.

С этой целью на 16–18-е сутки после опыления колосьев растений из незрелых зёрен пшеницы выделяли зародыши и культивировали

их на питательной среде MS с добавлением ФКЖ сильнопатогенного штамма гриба *F. graminearum*, характерного для южной зоны выращивания пшеницы [620, 621, 677]. Сублетальные концентрации ФКЖ определяли в экспериментах *in vitro* на эксплантах растений из популяций 4 сортов пшеницы — Обрий, Никония, Фантазия, Одесская полукарликовая (Од. п/к), полевая оценка устойчивости которых к патогену составляла 7, 6, 5, 2–3 баллов, соответственно. Критерием для оценки реакции эксплантов (зародышей) являлся уровень проросших из них на 3-и сутки культивирования *in vitro* и выросших из них затем проростков на 10-й день культивирования. Полученные проростки измеряли и подсчитывали процент отставания их в развитии, в сравнении с контрольным вариантом (не содержащим ФКЖ). Так, фактически ещё до уборки зерна, в условиях *in vitro* можно получать ориентировочный прогноз устойчивости полевого материала мягкой пшеницы к патогену.

Далее, под влиянием разных селективных факторов были изучены морфогенетические способности эксплантов, проявляющиеся при культивировании их в условиях *in vitro* (каллусогенез, эмбриоидогенез, регенерация растений). На первом этапе этой работы требуется подбор сублетальных концентраций селективных факторов, проверенных на модельных генотипах пшеницы с известным уровнем устойчивости к грибному патогену, и затем — определение параметров процесса, по которым можно представлять толерантность исследуемых эксплантов, в сравнении с устойчивостью генотипов к патогену, для выявления уровня их соответствия. Для этой работы были подобраны наиболее результативные, контрастные по патогенности штаммы гриба (№ 56-сильнопатогенный и *ab*-слабопатогенный) и определены их селективные концентрации на уровне целых семян и изолированных зародышей сортов-тестеров (с известной фитооценкой). Выявлена возможность использования в качестве теста показатели индукции каллусогенеза незрелых зародышей. Результаты воздействия ФКЖ на индукцию каллусогенеза незрелых зародышей модельных сортов пшеницы показали согласование их с данными фитопатологической оценки по устойчивости к патогену.

Для выбраковки неустойчивых к патогену генотипов на этапе регенерации растений из соматических эксплантов, образовавших каллусы, можно было использовать 50 %-ю концентрацию ФКЖ обоих штаммов гриба, приготовленных на питательной среде Чапека. Для

выбраковки образцов, низкотолерантных к патогену на уровне культуры пыльников, селективной была 5 %-я концентрация ФКЖ слабопатогенного штамма.

В результате проведенной экспериментальной работы [622, 623, 624] была предложена система *in vitro*, которая позволяет на фоне ФКЖ гриба *F. graminearum*, двух контрастных по патогенности штаммов, проводить поэтапный отбор толерантных эксплантов мягкой пшеницы к фузариозу колоса, уровень толерантности которых в высокой мере соответствует уровню устойчивости исследуемой популяции растений пшеницы к данному возбудителю.

В итоге, предложенную для оценки и отбора толерантных форм мягкой пшеницы *in vitro* систему можно представить в виде следующего цикла последовательных операций: **1** — отбор из исследуемых образцов зерна пшеницы толерантных зрелых зародышей на указанных выше селективных средах с ФКЖ; **2** — выращивание из этих отобранных толерантных зародышей растений до формирования в зерновках незрелых зародышей нового поколения на срок их развития 10–15 дней после опыления; **3** — отбор из них толерантных зародышей на селективных средах с ФКЖ; **4** — индукция каллуса у отобранных толерантных незрелых зародышей на селективной среде; **5** — получение из каллусов растений-регенерантов; **6** — проведение на растительном материале этих регенерантов культуры пыльников с добавлением 5 % ФКЖ для выбраковки образовавшихся *in vitro* низкотолерантных образцов; **7** — заключительная фитопатологическая оценка на устойчивость к патогену гомозиготных растений-регенерантов пшеницы, полученных из пыльников растений, выращенных в полевых условиях [627].

Исходя из результатов, полученных на *F. graminearum*, была проведена работа по поиску методологических подходов к построению биотехнологии *in vitro* для оценки и отбора форм мягкой пшеницы с устойчивостью к альтернариозу, вызываемому грибными патогенами *A. tenuissima*, *A. trititica*, *A. infectoria* из рода *Alternaria*. Биотестирование зрелого зерна и изолированных зародышей разных сортов мягкой пшеницы, отличающихся по полевой оценке уровнем устойчивости к данным патогенам, в условиях двойной культуры (эксплант + ФКЖ гриба) позволило определить 30 % концентрацию ФКЖ в качестве селективной и пригодной для отбора форм мягкой пшеницы, толерантных к данному патогену. Полученные результаты можно использовать для построения *in vitro* тест-системы для первичного

скрининга изолятов гриба на токсигенность и отбора толерантных к альтернариозу форм озимой мягкой пшеницы.

В качестве дополнения к вышеизложенному материалу нами была проведена поисковая работа по решению актуальной для селекции ячменя задачи — определения пути увеличения устойчивости ярового ячменя к мучнистой росе в системе *in vitro*.

В биотехнологическую работу по созданию с помощью селекции *in vitro* устойчивых форм ярового ячменя к грибным патогенам и, в частности, к мучнистой росе (*Erysiphe graminis DC f. sp. hordei*) была предложена нетрадиционная схема получения устойчивого материала ячменя посредством культуры пыльников из гибридных форм, специально созданных для этой работы.

Для достижения поставленной цели были получены гибриды ячменя, в которых один из родителей имел повышенную устойчивость к данному патогену. Другой — использовался в качестве генетического источника повышенной гаплопродукционной способности при андрогенезе *in vitro*, в данном случае — это был сорт ярового ячменя Одесский 100. В итоге проведенной работы с культурой пыльников, полученных от скрещивания гибридов, только из одной гибридной комбинации удалось получить 15 гомозиготных линий с лучшим, чем у родителей, показателем устойчивости к патогену. Использование такого биотехнологического пути на специально подобранном указанном материале родительских форм для создания гибридов позволило получить из них линейный материал с уровнем устойчивости, превышающем его у исходных форм [628].

Таким образом, в результатах представленных исследований, проведенных сотрудниками нашей лаборатории по разработке систем *in vitro* для разных культур растений с целью использования их в селекционной работе по улучшению имеющегося и созданию нового генетически разнообразного материала, было показано, что современная биотехнология может эффективно и в короткий срок, по сравнению с традиционными методами, способствовать позитивному решению разных, актуальных в этом аспекте, вопросов селекции.

## Раздел 4

### СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТИВНЫХ СИСТЕМ ВЕГЕТАТИВНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* — ОПРЕДЕЛЯЮЩИЙ ПРИНЦИП РАЗРАБОТКИ ТЕХНОЛОГИЙ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ПОЛЕЗНЫХ, УНИКАЛЬНЫХ ФОРМ РАСТЕНИЙ С ЦЕЛЬЮ ИХ СОХРАНЕНИЯ, ОЗДОРОВЛЕНИЯ И ИНТРОДУКЦИИ, ПРЕДСТАВЛЕННОЕ В РАБОТАХ РАЗНЫХ ИССЛЕДОВАТЕЛЕЙ

Следующим направлением практически важных для растениеводства биотехнологий, основанных на приемах и методах *in vitro* и широко используемых в мире для размножения различных видов растений, является микроразмножение через меристемные ткани или меристемные группы клеток (зародыш, эмбриониды из единичных клеток, апекс, нормальные пазушные, спящие почки, молодые побеги) [363, 364, 365, 366, 369, 375].

Микроразмножение является клональным, когда получаемые отпрыски (клоны) идентичны исходному растению и — между собой. Успешно протекает этот процесс размножения, когда в качестве эксплантов используются апексы и пазушные почки органов стеблевого происхождения, поскольку они генетически стабильны и их меристемные ткани, организованные в виде множества дискретных зон, поддерживаются в течение длительного периода роста растений в активном состоянии [364, 370]. Одно из преимуществ этой технологии — высокий коэффициент размножения по сравнению с традиционными методами, который зависит от генотипа донора, его физиологического состояния (периода развития), от размера экспланта и его биологической компетентности. Выход полноценных растений из меристемы находится в зависимости от состава питательной среды, условий культивирования для укоренения и затем укоренения в почвенном субстрате. Для получения высокожизнеспособных растений на всех этапах процесса велико значение светового фактора и соотношения гормональных добавок в питательной среде для культивирования эксплантов. Эти факторы широко варьируются для видов и могут быть определены эмпирически. Возможность применения этого метода *in vitro* показана уже более чем на 500 видах растений.

Для клонирования многих культур подобранные условия на всех этапах настолько оптимизированы, что позволяют добиваться высокой воспроизводимости и в итоге — хорошей результативности процесса и создавать на этой основе высокоэффективные коммерческие предприятия для массового получения посадочного материала [365].

Клональное микроразмножение используется для создания коллекций сортов и видов, необходимых для селекционно-генетических работ и для сохранения исчезающих, редких видов растений [370]. Для оздоровления плодовых, декоративных, лекарственных, цветочных и других полезных видов растений от вирусов используется клональное микроразмножение посредством верхушечной меристемы с одновременной термотерапией (тепловой обработкой (30–40 °C) [282, 364, 365, 370]. Наиболее рентабельным в этом плане считается оздоровление картофеля, земляники и других культур в аспекте поддержания их коллекций, образцов элиты и суперэлиты [371]. Для быстрого размножения новых сортов, с целью экономии затрат на начальных этапах их внедрения в производство, этим методом размножают многие декоративные культуры [364]. В последнее время коммерческие фирмы разных стран, производители гибридных семян  $F_1$  стали использовать этот метод для размножения первого поколения гибридов разных овощных культур [364, 372]. При необходимости поддержания ценных линий с мужской стерильностью, как, например, лука в сравнении с трудоёмким способом беккроссирования, выгодно производить его используя именно этот путь микроразмножения [373].

Особый интерес представляет использование данного биотехнологического приёма для древесных культур вследствие значительной длительности в их развитии периода до наступления фазы плодоношения и получения семян, зачастую с длительным периодом покоя и потому с невозможностью быстрого получения семенной репродукции, необходимой для лесоводческого производства. Кроме этого, важность в проведении работы по клональному размножению неоценима при интродукции ценных древесных и декоративных видов растений в новые условия произрастания [365, 376]. Однако необходимо заметить, что при востребованности метода для разных целей растениеводства и при заманчивости достижения ещё и одновременного оздоровления размноженного материала, широкое развитие клонального микроразмножения в настоящее время значительно сдерживается по ряду объективных причин. Первая причина — у многих хозяйственно-ценных видов довольно сложно получить активную

регенерацию и окоренение, что вызывает их пролонгированное пребывание в культуре *in vitro* и лишние затраты на получение посадочного материала, и потому отдельные этапы процесса требуют ещё доработки и упрощения. Вторая причина — наличие проблем, из-за которых получаемые в результате размножения растения не всегда аналогичны исходному материалу из-за непредсказуемо возникающей у них генетической изменчивости на уровне спонтанных генных и хромосомных мутаций, которые нежелательны для размножаемого генотипа.

Проведенные исследования позволили установить, что для обеспечения генетической стабильности размножаемого образца предпочтительным эксплантом являются пазушные побеги, поскольку добавочная меристема (возникающая в каллусных клетках) более предрасположена к мутагенезу. Вероятность появления мутаций может быть снижена при использовании в качестве эксплантов молодых, наименее дифференцированных тканей из различных органов, а также при тщательном подборе концентраций и соотношения гормонов для сдерживания нежелательного каллусогенеза у культивируемых эксплантов [286, 287, 367, 368]. И поэтому необходимость проведения дополнительных исследовательских работ для многих культур очевидна.

При другом типе микроразмножения — черенковании — в качестве экспланта используют придаточные побеги, в достаточном количестве образующиеся у растений различных видов на разных органах — фрагментах междоузлий, листьях, стеблях, корнях и клубнях (фиалки, бегонии, луковичные, яблоня, вишня, алыча, виноград, смородина и др.) [364, 373, 377]. Подходят для этой работы и виды растений, образующие луковичы и клубнелуковичы, а также растения, у которых не образуются пазушные побеги [370]. Регенерация придаточных побегов на эксплантах из органов может быть получена у большого числа растений при тщательном подборе оптимальных концентраций гормонов для регенерации побегов. В данном случае метод *in vitro* представляет собой усовершенствованный миниатюризированный вариант традиционного черенкования, который позволяет значительно уменьшить размер экспланта и использовать для его выделения наиболее молодые органы с большим числом меристематических клеток для усиления регенерации побегов.

Часто в ускоренных циклах культивирования используют для регенерации возникающую каллусную ткань в местах среза, во избежа-

ние снижения активности регенерации и появления изменчивости у регенерированных побегов. В этом случае размножения образование корней часто происходит спонтанно, при переносе регенерантов на среду без цитокинина [364]. Полученные растеньица рассматривают как небольшие укоренённые черенки. Считают, что данная система размножения обладает минимальным риском для возникновения генетических нарушений. И по сравнению с традиционными методами, этот путь размножения значительно экономит время получения посадочного материала и площади, многократно увеличивая коэффициент размножения [366]. Кроме фруктовых деревьев, винограда и цветочных культур, эту систему размножения пытались использовать для размножения ягодных и овощных культур растений, таких как — малина, земляника, черника, люцерна, сахарная свёкла, капуста, томаты, табак [364, 374, 378, 371, 379].

Большие надежды в плане решения существующих проблем при различных используемых *in vitro* способах массового размножения растений возлагают на соматический эмбриогенез в клеточных суспензионных культурах. Поскольку этот путь морфогенеза наблюдается в экспериментах нередко и описан он более чем для сотни видов из различных семейств высших растений [380]. Соматический эмбриогенез, являясь асексуальным процессом развития зародышеподобных структур, наблюдается в клеточных популяциях как репродуктивных, так и соматических тканей, и во многом подобен зиготическому эмбриогенезу. Главными факторами, обуславливающими этот процесс, являются тип экспланта и стадия развития, а также оптимально подобранные для всех этапов питательные среды и условия культивирования [381]. Факторы, определяющие тип соматического эмбриогенеза, прямого — при отсутствии каллусной массы и непрямого — при активной пролиферации клеток каллуса, не детерминированы, так как для каждого из них не определены условия возникновения. И наблюдаться они могут одновременно при одних и тех же параметрах культивирования экспланта [391]. Однако у многих экономически важных культур ещё не преодолены трудности в реализации регенерационного потенциала по обоим типам этого пути морфогенеза.

В настоящее время исследования активно проводятся на различных культурах в плане изучения эффективности каждого из путей морфогенеза и поиска возможностей её увеличения с учетом особенностей растительных видов. Так, при получении регенерантов

через каллусогенез у свёклы отмечена роль гормонального баланса исходного растения в отдельных стадиях процесса, а также выявлено отрицательное влияние высокой температуры при культивировании экспланта на ранних этапах, и далее — на последующий процесс регенерации [383]. На других культурах определена важная роль раневой поверхности экспланта для последующего процесса его регенерации [384]. Исследование путей прохождения соматического эмбриогенеза у клематиса позволило создать эффективную систему регенерации биполярных эмбриоидов для одного из наиболее интересных по декоративности его генотипов через прямой и не прямой пути органо-генеза, используя в качестве экспланта вегетативные почки 3–5-летних растений и модифицированный вариант питательной среды MS [385]. Изучение интродукции рододендрона *R. ledebourii* в условия Сибири потребовало проведения большой работы по созданию эффективной системы регенерации эксплантов из аксиллярных почек в течение различных периодов вегетации. Оказалось, что их морфогенетическая активность зависела от времени года в период изоляции эксплантов для работы *in vitro*, и её можно было регулировать цитокининами [386].

Для некоторых однодольных видов при невысоком уровне встречаемости у них соматического эмбриогенеза проблемой является асинхронность протекания отдельных стадий, и особенно регенерации эмбриоидов, что пролонгирует время получения растений и увеличивает их стоимость. Ключевыми моментами в решении данных проблемных вопросов, например, на агаве (*Agave fourcroydes*), по мнению авторов, являются подбор для работы эксплантов с более высоким морфогенным потенциалом и обязательное присутствие на первых этапах культивирования высоких концентраций цитокинина БАП в питательной среде [387]. Для таких однодольных, как злаки, используя возможности эмбриоидогенеза при культивировании новообразований из пыльников, можно получать дополнительное число растений за счёт активной их индукции из адвентивных почек регенерирующего побега, изменив условия культивирования и концентрации компонентов среды [388, 389]. Использованием такого же подхода в культуре пыльников картофеля удалось добиться эффективного размножения дигаметоидов [390]. Для других видов, как например, люцерны, эспарцета и подсолнечника, нами были предложены системы *in vitro* клонирования на основе использования разных путей активации меристемных зон их проростков, полученных в

культуре *in vitro* (рис. 4.1), что в любое время года можно с успехом использовать для ускоренного размножения ценных селекционных форм данных культур.

Таким образом, улучшение условий культивирования и поиск неиспользованных ресурсов для достижения высокой технологичности всех этапов результативных путей морфогенеза с целью разработки биотехнологий микроразмножения непрерывно продолжаются. Пока ещё во многом не удалось преодолеть трудности в создании оптимальных условий для работы с соматическими зародышами как с посадочным материалом. Учёные считают, что этот метод *in vitro* может явиться биотехнологией, с помощью которой на уровне хранящихся в криобанках искусственно инкапсулированных «семян», полученных из соматических зародышей, можно будет и размножать материал, и создавать международные обменные генетические фонды ценных растительных культур для использования их в различных целях [382].

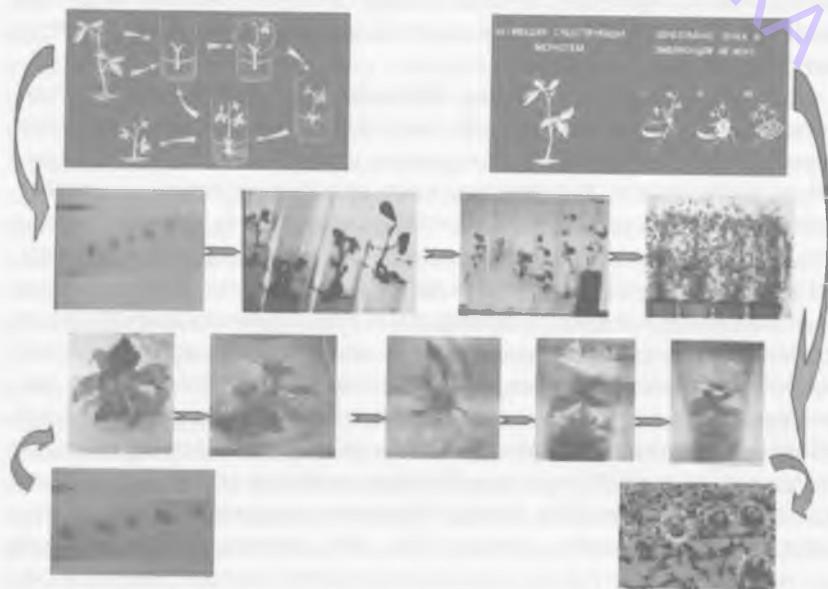


Рис. 4.1

## РЕЗУЛЬТАТЫ РАЗРАБОТОК ПЕРСПЕКТИВНЫХ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ НА ОСНОВЕ МЕТОДОВ *IN VITRO* ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ТИПОВ РАСТЕНИЙ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ВИДОВ С ЦЕЛЬЮ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИХ В РАЗНЫХ НАПРАВЛЕНИЯХ СЕЛЕКЦИИ

Наряду с рассмотренными и уже активно используемыми в настоящее время в растениеводческой практике клеточными технологиями, во многих странах продолжают интенсивные поиски нетрадиционных биотехнологических подходов селекции, которые могли бы принципиально изменить путь создания новых типов растений посредством прямого введения в их клетки генов, определяющих желаемые признаки. С развитием методологии генетической инженерии — появилась перспектива конструировать функционально активные генетические структуры в форме рекомбинантных ДНК из геномов различных организмов и вводить такие конструкции в клетки, создавая условия для экспрессии введённых генов в реципиентном геноме. А значит, открылись возможности для развития целенаправленной селекции сельскохозяйственных культур.

Повышенный интерес к генно-инженерным методам обусловлен и появляющейся возможностью снятия барьеров несовместимости между видами и родами, содержащими привлекательные для селекции растений признаки и свойства. И этим преодолевать ограничения скрещиваний между биологически отдалёнными видами путём непосредственного манипулирования генами, вместо длительной и объёмной работы, проводимой традиционной селекцией. Исследования по генной инженерии получили своё развитие на рубеже 70–80-х годов, когда технология рекомбинантных ДНК стала разрабатываться на основе природного пути — переноса бактериальных генов посредством Ti-плазмиды в геном растения в процессе галлообразования. Интенсивная работа по разработке методов переноса генов в растения в лабораториях научных центров различных стран и созданных для этой цели специализированных фирмах привела к значительному пополнению набора применяемых методов и сделала их разнообразными. Наряду с Ti-плазмидными векторами появились

различные векторные системы на основе Ri-плазмид *Agrobacterium*, транспозируемых элементов растений, вирусов и вириодов, ДНК оргanelл, а также прямые методы введения генетической информации в растительные клетки (прямая трансформация голой ДНК, микроинъекции, электропорация, упаковка в липосомы). Всё это позволило значительно расширить возможности конструирования растений с изменёнными признаками экспериментальным путём [358, 392, 393]. Использование маркерных бактериальных генов (*E.coli*) для переноса генетической информации в растения табака и доказательство их экспрессии по устойчивости к антибиотикам позволило успешно завершить сложные эксперименты и продемонстрировать интеграцию и активность чужеродных прокариотических генов в геноме растений [392].

Первыми опытами, открывшими эру создания возделываемых растений с полезными признаками посредством трансгеноза, считают эксперименты, когда с помощью Ti-плазмиды удалось осуществить введение генов одного вида в клетки другого, генетически отдалённого вида. Это был перенос гена фазеолина бобов в клетки генома подсолнечника, которые так и не удалось перевести на уровень растения, и они остались в клеточной массе [394]. Вскоре появилось сообщение о передаче этого же гена в клетки табака и об экспрессии его во всех тканях регенерантов, полученных из этих клеток, хотя с несколько сниженным уровнем экспрессии гена, по сравнению с наблюдаемым её уровнем в зрелых семядолях бобов [395]. Дальнейший прогресс и существенное расширение возможностей генно-инженерных методов и разработки способов генетической трансформации наметился с интенсивным развитием методов культивирования растительных тканей и клеток в условиях *in vitro*. Когда стало возможным использовать различные растительные экспланты в качестве реципиентных систем для введения в условиях *in vitro* чужеродных генов или их комбинаций в наследственный аппарат растения и получать трансгенные регенеранты, были использованы листовые диски и протопласты, с которыми совместно культивировали агробактерии, проводили слияние протопластов со сферопластами бактерий. Сделаны попытки также подвергнуть агробактериальному заражению незрелые зародыши и осуществить микроинъекции в меристематические клетки и провести трансформацию, используя пыльцевые зёрна [358].

В дальнейшем, используя гены T-ДНК как селективные маркеры, в протопласты табака были «прямо» перенесены гены, опреде-

ляющие устойчивость к канамицин-сульфату, в результате чего получены первые трансгенные клеточные линии. Впоследствии были получены и трансгенные растения различных имеющих экономическое значение видов, среди которых уже были и злаковые культуры. Позднее, на основе электропорации в электрическом поле эмбрионидов и эмбрионного каллуса кукурузы, был предложен новый подход к достижению генетической трансформации, в результате чего получены трансгенные растения, устойчивые к канамицин-сульфату. С помощью микроинъекций ДНК в эмбриониды микроспор рапса были созданы трансгенные растения этого вида. Проводимый в настоящее время перенос генов посредством так называемой баллистической трансформации (*biolistic, agrolistic*), позволяет доставлять ДНК, осаждённую на частичках металла, прямо в ядра или хлоропласты растительных клеток и тканей и добиваться успеха. Считают, что данный метод при наличии инструмента несложен и может быть использован на разных эксплантах различных видов растений, в том числе и древесных культур. И потому в настоящее время он получает в мире широкое распространение. Доказательством этому служит результат получения трансгенных растений более чем у тридцати видов [358, 393, 394].

Так, методы *in vitro* растений становятся важной частью генно-инженерной биотехнологии, главная цель которой — создание нового растительного материала в виде линий, гибридов и сортов возделываемых культур. В настоящее время генно-инженерные работы, направленные на цели селекции, интенсивно проводятся в научных учреждениях различных стран в следующих направлениях — повышение общей продуктивности растений и регуляции сроков их созревания; устойчивости — к гербицидам, насекомым, вирусам, грибным и бактериальным патогенам, нематодам, к абиотическим стрессам. Работы по генетической инженерии были направлены также и на получение форм с мужской стерильностью, с изменённым аминокислотным и жирнокислотным составом семян; с изменённым составом накапливаемых ими углеводов и вторичных метаболитов, вкусовых, и товарных свойств у плодов; а также ещё — и на улучшение декоративных свойств у цветочных и древесных культур; на синтез антител и вакцин, и белков в трансгенных растениях. Несмотря на небольшой срок существования генно-инженерного направления, однако вследствие стремительности его развития, к сегодняшнему дню уже созданы образцы изменённых растений, которые проходят испыта-

ния в различных экспериментах на биологическую и генетическую стабильность, а также и на хозяйственную ценность.

Исходя из задач каждого направления, можно привести уже некоторые интересные примеры воплощения научных идей в жизнь и показать практическое осуществление получения экспериментальным путём уникальных форм экономически ценных видов растений с конкретными признаками. Так, введение в табак гена гемоглобина бактерии *Vitreoscilla* привело к значительному увеличению в нём накопления сухих веществ на 80–100 % и усилило накопление хлорофилла и никотина [396]. Применение комплекса генов нескольких растительных видов, кодирующих синтез различных белков и синтезаты жирных кислот из дрожжей для трансгеноза томата, позволило достичь высокой продуктивности у его отдельных форм в сочетании с хорошими техническими и вкусовыми качествами плодов [395]. В случае регуляции срока созревания плодов у томата удалось исключить один из генов синтеза этилена, регулирующего созревание плодов, и тем самым продлить их срок созревания при хранении [397]. Трансгенные растения, несущие гены устойчивости к гербицидам, были созданы одними из первых. Клонирование достигнуто для генов устойчивости к глифосату, фосфинотрицину, далапону и другим хлорсульфоновым и имидазолиновым гербицидам. С их использованием созданы трансгенные растения кукурузы, сои, хлопка, гороха [398, 413]. Десятилетняя по длительности проведения работа получения трансгенного картофеля, устойчивого к колорадскому жуку, на основе гена синтеза дельта-эндотоксина с высокой экспрессией в растениях завершена, и считают, что её ожидает коммерческий успех [399]. Испытания проходят трансгенные формы яблони и грецкого ореха, картофеля, устойчивые к разным насекомым, в том числе и к колорадскому жуку [400]. Несколько подходов к разработке устойчивости к вирусам через трансгеноз позволили получить трансгенные растения, несущие устойчивость к вирусу мозаики огурца и табака, а также — устойчивые к X-вирусу, растения картофеля [402]. Удалось получить трансгенные растения табака, обладающие повышенной устойчивостью к грибному патогену *Botrytis cinerea* [403].

Получены трансгенные растения картофеля с одновременной устойчивостью к бактериальной гнили и устойчивостью к грибной инфекции — фитофторе [404]. С устойчивостью к абиотическим факторам, а именно к засухе, удалось получить люцерну при введении гена супероксиддисмутазы от табака, обладающую и повышенной

продуктивностью зелёной массы [405]. И с другой стороны — получен табак с устойчивостью к пониженным температурам со встроенным геном десатуразы из сине-зелёных водорослей [406].

При использовании гена HAL 1 из дрожжей были получены трансгенные растения дыни, способные развиваться в присутствии высокого содержания NaCl в питательном растворе [407]. запатентован способ создания мужскостерильных форм у различных видов растений путём скрещивания двух заранее созданных трансгенных видов. Считают, что это позволит решить проблему создания ценного селекционного материала для гибридной селекции многих культур [408]. К настоящему времени созданы трансгенные растения клевера, несущие ген синтеза белка подсолнечника с повышенным содержанием серосодержащих аминокислот [409]. Множество разноплановых работ по созданию трансгенных растений, способных к продукции различных веществ, необходимых для химической, пищевой и фармацевтической промышленности, проводится в научных центрах различных стран. Изменение содержания низкомолекулярных жирных кислот в маслах разных видов масличных культур является одной из целей селекции. В этой связи проведена работа по созданию трансгенных форм рапса с увеличенным содержанием необходимой для различных производств лауриновой кислоты. Клонирование гена дикорастущего в Америке растения умбеллюлярии, содержащего это вещество в семенах до 70 %, и перенесение его в рапс позволило получить трансгенные растения этой культуры с высоким содержанием данной ценной жирной кислоты [410]. Многопланово проводится генно-инженерная работа по созданию трансгенных форм растений с повышенной способностью к накоплению различных лекарственных алкалоидов и выделения их в последующем в чистом виде для фармацевтических целей, а также по созданию форм, синтезирующих вещества фенольной природы, для использования в различных производственных областях [411].

Один из важных аспектов генной инженерии — получение антител, белков животного происхождения в трансгенных растениях — осуществлён в проекте по экспрессии генетической системы антиферретин scFv- антитела в табаке [412]. В другой работе на табаке была продемонстрирована экспрессия системы по сборке секреторных моноклональных иммуноглобулинов [414]. Показана также возможность получения в трансгенных растениях бактериальных антигенов для использования их в качестве вакцин [415].

В некоторых коммерческих фирмах за рубежом проводится работа по получению трансгенных декоративных цветочных культур. Примером тому являются работы с петунией, в которых удалось получить растения с различными оттенками красного цвета за счёт генов окраски из герберы [415]. Уже имеются патенты на получение цветов гвоздики и хризантем с голубой окраской в фирме Florigen [416]. Мы назвали здесь лишь только единичные из широко известных примеров. Их можно было продолжать демонстрировать, поскольку, по сообщению международных экспертов из США [417], к настоящему времени уже 13 стран мира занимаются производением трансгенных растений различных видов. Только в США их высевается около двух тысяч. Площадь, которая ими засеивается в мире, в настоящее время занимает около 44,2 млн гектаров. И, конечно, на пути их распространения в мировое сельскохозяйственное производство существует ещё множество научных и социальных проблем, но приведенные экспертами данные впечатляют масштабом и темпом развития генно-инженерного направления.

В дополнение к представленному материалу необходимо кратко остановиться ещё на одном развивающемся биотехнологическом методе переноса генетической информации, который базируется на слиянии изолированных протопластов в условиях *in vitro* — соматической гибридизации. Это одно из направлений тонких технологий — на стыке клеточной и генной инженерии, требующее для своего осуществления необходимых условий и опыта в работе с клеточными культурами.

Методические подробности по способам выделения протопластов из разных эксплантов, их применение в работах по соматической гибридизации различных видов, описаны в специальной литературе [418]. Нашей задачей является лишь представление краткой информации о перспективах работы в этом направлении и об отдельных уже полученных результатах. В случае соматической гибридизации носитель генетической информации — ДНК не представлен изолированными специфическими генами, а конструируется на основе структурных генетических компонентов растительной клетки.

Первые эксперименты на протопластах табака, проведенные Carlson et al. [419], Melchers [420, 421] и Глебой [422], показали возможность создания новой комбинации блоков генов и целых геномов в одном генотипе растения при получении регенерантов от слившихся протопластов двух несовместимых при половой гибридизации генотипов. Фактически этими работами была показана реальная перспек-

тива создания растений нового типа. Продемонстрирована возможность получения данным путём генетических форм, относящихся к различным биологическим типам: гибридных, содержащих ядерные геномы родительских форм; цибридных, когда сливаются цитоплазма и ядро от разных родителей; асимметричных гибридов — геномы которых представлены различными комбинациями ядерных и цитоплазматических генов родителей; а также появляется вероятность достижения обмена и переноса органелл (хлоропластов и митохондрий), отвечающих за важнейшие признаки растений (устойчивость к болезням и ЦМС). Всё это вызвало большой интерес у генетиков и селекционеров и, прежде всего, в плане создания генетического разнообразия разных культур, что особенно важно для случаев, когда имеются ограничения в обмене генами или во введении чужеродных генов при традиционных методах селекции. Уже спустя десятилетие после первых работ Глеба с соавторами [423] отмечают, что полученные ими и другими исследователями данные убедительно доказывают, что с использованием этой техники действительно возможно получение внутривидовых, межвидовых, межродовых, межтрибных и межсемейственных гибридов. В тот период на уровне жизнеспособных растений удалось получить лишь первых три типа гибридов, остальные могли существовать только на клеточном уровне, а парасексуальные гибридные растения были созданы у представителей десяти родов и двух семейств (паслёновые и крестоцветные).

Наиболее успешным оказалось применение этой техники на представителях семейства паслёновых — более 30 внутривидовых и около 40 межвидовых соматических гибридов [424]. Из первых экспериментов исследователям стало понятно, что с помощью слияния протопластов можно по-новому комбинировать родительские гены высших растений. В частности, получать генотипы гетерозиготные по внеядерным генам: ядра которых происходят от одного родителя, а цитоплазма от другого; когда одна часть внеядерных генов происходит от одного родителя, а вторая — от другого родителя. То есть, появились перспективы для манипулирования внеядерными генами и осуществления переноса различных цитоплазматических мутаций. Это в практическом плане чрезвычайно важно, когда, например, такими генами могут быть гены цитоплазматической стерильности и резистентности к воздействию различных факторов или гены белков и физиологически важных компонентов пластид и хлоропластов, связанные с цитоплазмой растений [332].

Соматическая или парасексуальная гибридизация особенно привлекательна в использовании её для целей получения отдалённых гибридов, которые из-за про- и постгамной несовместимости невозможно получить путем обычных скрещиваний у филогенетически отдалённых видов. Считают, что наиболее успешно может быть осуществлено получение высокоасимметричных гибридов, когда небольшая часть ядерного генома (хромосомы) и связанные с ним признаки от донора могут быть перенесены реципиенту. В таких случаях используется направленная элиминация генетического материала, например, обработка рентгеновскими лучами протопластов донорного генотипа.

Первые эксперименты, проведенные в разных странах, увенчались получением на уровне растений гибридов паслёновых различной степени асимметричности. Такие гибриды получены в Украине в Институте ботаники между *N. plumbaginifolia* и *N. sylvestris*, и *N. plumbaginifolia* и *A. belladonna*, а также *S. tuberosum* и *S. pinnatisectum*, и между *N. plumbaginifolia* и *P. hybrida*, *Lycopersicon esculentum* [332, 358]. Что же касается злаковых культур, то у этих видов пока ещё есть нерешённые методические проблемы по регенерации растений из протопластов. Но первые результаты уже удалось получить на рисе — это внутривидовые мужскостерильные цибриды [425], межвидовые гибриды риса и *Zizania latifolia* [426] и транспластомные формы [цит. по 427]. Доказательства возможного осуществления переноса ограниченного количества ядерного материала в комбинациях генотипов, которые не являются совместимыми, получены уже на уровне фертильных гибридных особей и это, несомненно, является большим достижением генно-инженерного направления биотехнологии.

Однако необходимы дальнейшие разработки вопросов регуляции генной экспрессии в процессах морфогенеза и развития клеточных популяций, а также исследование механизмов экспрессии чужеродных генов. Это будет способствовать активному развитию соматической гибридизации, одному из интереснейших биотехнологических методов. И позволит обогатить селекционный материал различных растений новыми полезными генами, перенесением их из известных, но пока методически и инструментально недоступных исследователям, ценных родов и видов.

В представленном в разных разделах данной работы материале показаны развитие и результативность различных направлений клеточной биотехнологии растений, базирующихся на методах культивирования клеток, тканей и органов *in vitro*, и ставящих своими главными целями создание растений нового типа, обладающих гомозиготностью, высокой продуктивностью и адаптивностью к стрессам. Показано совершенствование имеющихся биотехнологических методов и разработка новых подходов к решению разных вопросов селекции и генетики возделываемых культур растений. Приведены результаты использования биотехнологий для получения генетического разнообразия и стабилизации новых ценных форм отдалённых гибридов злаков, размножения растительного материала с целью увеличения эффективности и ускорения его селекции.

Отмечены преимущества, проблемы и недостатки биотехнологических приёмов и способов, лежащих в основе развивающихся и уже использованных в селекционно-генетической практике *in vitro* биотехнологий и продемонстрированы результаты экспериментального поиска их эффективности. Уделено внимание представлению биотехнологических разработок на интенсивно развивающихся перспективных генно-инженерных подходах. Приведены первые полученные в мире данные по реализации в селекцию созданного с помощью разных биотехнологий на основе методов *in vitro* экспериментального генетического материала разных культур злаков и новых гибридов и линий других экономически ценных культур растений, что было показано по ходу изложения материала. Однако для решения поставленных перед биотехнологией важных и непростых задач необходимо дальнейшее продолжение разноплановых исследований на основе фундаментальных знаний генетики, эмбриологии, физиологии растений и фитопатологии, которые позволили бы приблизить осуществление интересных в теоретическом и практическом аспектах проектов и программ направленной селекции ценных культурных растений.

## Список использованной литературы

1. Haberlandt G. S. Kulturversuche mit isolirten Pflanzenzellen // Sitzungsbergen Akademie Wissenschaften, Wien, Mathnatur. — 1902. — Bd III. — P. 69–92.
2. Бутенко Р. Г. Перспективы использования культивируемых клеток растений в биотехнологии. — М.: Наука, 1984. — С. 239–247.
3. Хохлов С. С., Тырнов В. С., Гришина Е. В., Давоян Н. И., Зайцева М. И., Селиванов А. С., Суханов В. М., Шишкинская Н. А., Гусева А. И. Гаплоидия и селекция. — М.: Наука, 1976. — 231 с.
4. Ницше В., Венцель Г. Гаплоидия в селекции растений. — М.: Колос, 1980. — 126 с.
5. Swaminathan M. S. Rice // Scientific American. — 1984. — Vol. 250, № 1. — P. 63–67.
6. Maheshwari S. C., Rashid A., Tyagi A. K. Anther pollen culture of haploids and their unility // I. A. P. T. C. Newsletter. — 1983. — № 4. — P. 2–7.
7. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнологии на их основе: Учебное пособие. М. 1999. С. 159.
8. Бутенко Р. Г. Клеточные технологии для получения экономически важных веществ растительного происхождения // Культура клеток растений и биотехнология. М.: Наука. С. 3–20.
9. Лёви А., Сикевец Ф. Структура и функции клетки. М.: Мир, 583 с.
10. Anonymous 401 Research Group. Primary study on induction of pollen plants of *Zea mays* // Acta Genetica Sinica. — 1975. — № 2. — P. 143–145.
11. He Ding-Doang., Urang Jun-Wen. Callus and plantlet formation from cultured wheat anthers at different developmental stages // Plant. Sci. Letters. — 1984. — Vol. 33, № 1. — P. 71–79.
12. Heberle-Bors E. Isolation pollen culture in tobacco: Plant reproductive development in nutshell // Sex. Plant reprod. — 1989. — № 2. — P. 1–10.
13. Нобел П. Физиология растительной клетки. М.: Мир, 1973. 287 с.
14. Суханов В. М. Андроклиния и ее особенности у пшеницы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / Саратовск. Гос. ун-т. — Саратов, 1983. — 22 с.
15. Heberle-Bors E., Reinert J. Androgenesis in isolated pollen cultures of *Nicotiana tabacum*: dependence upon pollen development // Protoplasma. — 1979. — Vol. 99, № 3. — P. 237–245.
16. Sunderland N. M. Induction of growth in the culture of pollen // Differentiation in vitro. Cambridge: Cambridge University Press. — 1982. — P. 12.
17. Лаптев Ю. П. Гетероплоидия в селекции растений. — М.: Колос, 1984. — 247 с.
18. Miao S. H., C. W. Kuo, J. Z. Kwei, A. T. Sun, S. J. Ku et al. Induction of pollen plants of maize and observations on their progeny // Proceed. Symposium on Plant Tissue Culture. Peking Science Press. — 1978. — P. 23–33.
19. Sunderland N. M., Evans L. J. Multicellular pollen formation in cultured barley anther. The A, B and C pathways // J. Exper. Bot. — 1980. — Vol. 31, № 121. — P. 501–514.
20. Chen C C. Studies on the anther culture of rice: Pollen stage and low temperature treatment // Natl. Sci. Counc Mon Taipei. — 1976. — Vol. 4. — P. 2187–2190.
21. Ono H., Larter E. N. Anther culture of Triticale // Crops Science. — 1976. — Vol. 16, № 1. — P. 120–122.
22. Chu C C, Wang C S, Sun C S, Jin K. C, Chu C J, Bi F J. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources // Sci. Sinica. — 1975. — Vol. 8. — P. 659–668.
23. Wang C C, Chu C C, Sun C S, Jin K C, Hsu C. The androgenesis in wheat (*T. aestivum*) anthers cultured in vitro // Sci. Sinica. — 1973. — Vol. 16. — P. 218–222.
24. Sunderland N., Dunwell J. M. Anther and pollen culture // Ed. Street H. E. Plant tissue and cell culture. Blackwell, Oxford. — 1977. — P. 223–265.
25. Pescitceli S. M., Petolino J. F. Microspore development in cultured maize anthers // Plant Cell Rep. — 1988. — Vol. 13. — P. 47–53.
26. Pretova A. N., de Ruijter A., van Lammeren, Schel L. H. Structural observations during androgenic microspore culture of the 4 c1 genotype of *Zea mays* L. // Euphytica. — 1993. — Vol. 65. — P. 61–69.
27. Kuo C. S., Lu Wenliang, Kui J. L. Corn (*Zea mays* L.): Production of Pure Lines Through Anther Culture // Biotechnology in Agriculture and Forestry 2. — Crops 1. — Springer-Verlag, Berlin. — 1986. — P. 168–180.

28. Sunderland N. M., Evans L. J. Multicellular pollen formation in cultured barley anther. The A, B and C pathways // *J. Exp. Bot.* — 1980. — Vol. 31, № 121. — P. 501–514.
29. Wilson H. M., Mix G., Foroughi-Wehr B. Early microspore division and subsequent formation of microspore calluses at high frequency in anther of *H. vulgare* L. // *J. Exp. Bot.* — 1978. — Vol. 29. — P. 227–238.
30. Рахимбаев И. Р. Биотехнология зерновых культур. — Алма-Ата: Гылым, 1992. — 239 с.
31. Sun C S. Androgenesis of cereal crops. Protoplasts and tissue culture methods in crop plants improvement // *Proc. Symp. Plant Tissue Cult. Science Press. Peking.* — 1978. — P. 117–123.
32. Sun C S, Chu C C, Li S Q. Ultrastructural changes of rice pollen callus cell grown on differentiation medium // *Acta Bot. Sinica.* — 1982. — Vol. 24. — P. 493–498.
33. Лукьянюк С. Ф. Разработка приемов *in vitro* для получения гаплоидов ячменя и тритикале: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / Ин-т общей генетики АН СССР. — М., 1983. — 17 с.
34. Шерер Н. В. Особенности гаплопродукции разных генотипов пшеницы в культуре пыльников: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / СГИ УААН. — Одесса, 1993. — 19 с.
35. Loo S W, Xu L H. Rice: Anther Culture for Rice Improved in China // *Biotechnology in Agriculture and Forestry 2. — Crops 1. — Springer-Verlag, Berlin.* — 1986. — P. 139–157.
36. Ouyang I W, Lhou S M, Jia S E. The response of anther culture to temperature in *Triticum aestivum* // *Theor. Appl. Genet.* — 1983. — Vol. 66. — P. 101–109.
37. Picard E., Buysier De J. Nouveaux resultats concernant la culture d'anthers de *Triticum aestivum* L. Conditions de regeneration des plantes haploides et production de lines entierement homozygotes // *C. R. Acad. Sci.* — Vol. 281. — P. 989–992.
38. Резникова С. А. Цитология и физиология развивающегося пыльника. — М.: Наука, 1984. — 269 с.
39. Тивари Ш. Морфогенез в культуре пыльников и изолированных микроспор ячменя: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.12 / ТСХАкад. — М., 1980. — 24 с.
40. Research Group 303, Institute of Genetics. Academia Sinica. Aprilinary report on the induction of pollen plants from rice and wheat // *Genet. Commun.* — 1972. — № 1. — P. 1–14.
41. Picard E. J. de Buysier. Obtention de plantlets haploides de *Triticum aestivum* a partir de cultures d'anthers *in vitro* // *C. R. Acad. Sci. Paris.* — 1973. — Vol. 277. — P. 79–95.
42. Ouyang T W, Hu H, Chuang C C, Tseng C C. Induction of pollen plants from anther of *Triticum aestivum* cultured *in vitro* // *Sci. Sinica.* — 1973. — Vol. 16, № 1. — P. 79–95.
43. Bajaj J. P. S., Gosal S. S. *Biotechnology of wheat improvement // Biotechnology in Agriculture and Forestry 2. — Crops 1. — Springer-Verlag, Berlin.* — 1986. — P. 3–38.
44. Nitsch C. La Culture de pollen isole Sur milieu synthetique // *C. R. Acad. Sci.* — Vol. 278. — P. 1031–1034.
45. Foroughi-Wehr B., Mix G., Gaul H., Wilson H. M. Plant production from cultured anthers of *Hordeum vulgare* // *Z. Pflanzenzuecht.* — 1976. — Vol. 77. — P. 198–204.
46. Picard E., J de Buysier I. High production of embryoids in anther culture of pollen derived homozygous spring wheats // *Ann. Amelior. Plant.* — 1977. — Vol. 27. — P. 483–488.
47. Hu Han. Improvement Through Anthers Culture // *Biotechnology in Agriculture and Forestry 2. — Crops 1. — Springer-Verlag, Berlin.* — 1986. — P. 55–72.
48. H. Hu, X. Tan, Q. Zhou. Anthers — Pollen Culture in Cereals // *Proceed of Intern Symposium Albena, Bulgaria.* — 1990. — P. 129–132.
49. Hu Han. Advances in anther culture investigations of plant tissue and cell culture in China // *Proceed. Symp. Plant Tissue culture. Science Press. Peking.* — 1978. — P. 3–10.
50. Wang C C, Chu Z C, Hsu C, Jin K C, Bi I J. Induction of pollen plants from the anther culture of *Triticum vulgare*-*Agropyron glaucum* hybrid // *Acta Genet. Sinica.* — 1975. — Vol. 2. — P. 71–77.
51. De Buysier I., Henry J. *In vitro* anther culture in wheat breeding // *Ann. Wheat Newsllett.* — 1981. — Vol. 27. — P. 54–56.
52. Lazar M. D., Collins G. B., Vian W. E. Genetic and environmental effects on the growth and differentiation of wheat somatic cell cultures // *J. Hered.* — 1983. — Vol. 74. — P. 353–357.
53. Chi-Chang Chen, Hsin-Sheng Tsay, Chien-Rong Huang. Rice *Oryza sativa* Factors Affecting Androgenesis // *Biotechnology in Agriculture and Forestry 2. — Crops 1. — Springer-Verlag, Berlin.* — 1986. — P. 123–138.
54. Kudirka D. T., Schaeffer G. W., Baenziger P. S. Cytogenetica characteristics of wheat plants regenerated from anther calli of «Centurk» // *Can. J. Genet Cytol.* — 1983. — Vol. 25. — P. 513–517.

55. Bullock W. P., Baenziger P. S., Schaeffer G. W. Bottino P. I. Anther cultura of wheat (*Tr. aestivum*) F, S and their reciprocal crosses // *Theor. Appl. Genet.* — Vol. 62. — P. 155–159.
56. Lazar M. D., Baenziger P. S., Schaeffer G. W. Combining abilities and heretibility of callus formation and plantlet regeneration in wheat (*Tr. aestivum* L.) anther cultures // *Theor. Appl. Genet.* — Vol. 68. — P. 131–134.
57. Shimada T., Makino T. In vitro culture of wheat. III Anther culture of the A genome aneuploids in common wheat // *Theor. Appl. Genet.* — 1975. — Vol. 46. — P. 407–410.
58. Lazar M. D., Chen T. H., Scoles G. T., Kartha K. K. Immature embryo and anther culture of chromosome additional lines of rye in Ch. Spring wheat // *Plant Sci.* — 1987. — Vol. 51. — P. 77–81.
59. Han Hu. In vitro induced haploids in wheat // S. M. Jain, S. K. Sopory, R. E. Veilleux (Eds), *In vitro Haploid Production in Higher Plants.* — 1977. — Vol. 4. — P. 73–97.
60. Rines H. W. Oat anther culture: genotype effect on callus initiation and production of haploid plants // *Crop Sci.* — 1983. — Vol. 23. — P. 268–271.
61. Miah M. A. A., Earle E. D., Khush G. S. Inheritance of callus formation ability in anther culture of rice, *Oryza sativa* L. // *Theor. Appl. Genet.* — 1985. — Vol. 70. — P. 113–116.
62. Quimi C. A., Zapata F. I. Diallel analysis of callus induction and green plant regeneration in rice anther culture // *Crop Sci.* — 1990. — Vol. 30. — P. 188–192.
63. Chen Z, Chen Q. Genetic studies of rice (*Oryza sativa* L.) anther culture // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* — 1993. — Vol. 34. — P. 177–182.
64. Butter B. In vitro haploid production in maize // S. M. Jain, S. K. Sopory, R. E. Veilleux (Eds), *In vitro Haploid Production in Higher Plants.* — 1977. — Vol. 4. — P. 1–35.
65. Petolino I. F Thomson S. A. Genetic analysis of anther culture response in maize // *Theor. Appl. Genet.* — 1987. — Vol. 74. — P. 284–286.
66. Barloy D. Etude de facteurs environnementaux et genetiques de l'androgenese in vitro chez le mais. caracterisation de lignees doubles. These 232, Unckersite de Clermont II. — 1990.
67. Butter B., Jumptong C., Berger-Buter K., Saisintong S., Schmid I. E., Thiraporn R, Stamp. Application of the anther culture technique in a corn breeding project in Thailand // *Abstr. VIII Intern. Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Firenze.* — 1994. — P. 85.
68. Cowen N. M., Jonson C. D., Armstrong k., Miller M., Woosley A., Pescitelli S., Skokut M., Belmar S., Petolino I. F. Mapping genes conditioning in vitro androgenesis in maize using P F L P analysis // *Theor. Appl. Genet.* — 1992. — Vol. 84. — P. 720–724.
69. Wan J., Widholm I. M. Formation of multiple embryo-like structures from single microspores during maize anther culture // *Plant Cell Rep.* — 1992. — Vol. II. — P. 529–531.
70. Murigneux A., Betolina S., Harley T., Bauds S., Quitton C., Jullien H., Ben Tahar S., Freyssinet G., Beckert M. Genotypic variation of quantitative trait loci controlling in vitro androgenesis in maize // *Genome.* — 1994. — Vol. 37. — P. 970–976.
71. Foroughi-Wehr B., Mix G., Gaul H., Wilson H. M. Plant production from cultured anthers of *Hordeum vulgare* L. // *J. Planthenzuecht.* — 1994. — Vol. 77. — P. 198–204.
72. Islam M. R., Kinizios S., Fischbeck G. Anther culture responsivetes of *Hordeum spontaneum* derived spring barley lines and a genetic analysis of plant regeneration // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* — 1992. — Vol. 29, № 3. — P. 235–239.
73. Zhou C. Z., Jang H. J. Anther culture and androgenesis in *Hordeum vulgare* L. // *Acta. Bot. Sinica.* — 1980. — Vol. 22. — P. 211–214.
74. Powell W., Diallel analysis of barley anther culture response // *Genome.* — 1988. — Vol. 30. — P. 101–109.
75. Larsen E. T., Tuveesson I. K. D., Andersen S. B. Nuclear genes affecting percentage of green plants in barley *Hordeum vulgare* L., anther culture // *Theor. Appl. Genet.* — 1990. — Vol. 199. — P. 417–420.
76. Dunwell I. M., Francis K. J., Powell W. Anther of *Hordeum vulgare* L.: a genetic study of microspore callus production and differentiation // *Theor. Appl. Genet.* — 1987. — Vol. 74. — P. 60–64.
77. Marchetti S., Glorando A., Pappalardo C., Oliveri A. M. Nuclear and cytoplasmic control of response in barley (*Hordeum vulgare* L.). // *Journal of Genetics and Breeding.* — 1995. — Vol. 49, № 1. — P. 15–20.
78. Powell W., Forster B. P., Thomas W. T. B., Waugh R., Chalmers K. J., Barua U., Hakim L., Young G. R., Macaulay M., Hackett C. A., Mc Nicol J. Doubled haploids: their role in the location and analysis of polygenically controlled traits in barley // *Scottish Crop Research Institute Annual Report.* — 1991. — P. 36–40.
79. Ryoppy P., Honkanen J., Tigersted T. Increasing the efficiency of triticae anther culture // *Genetic Manipulation in Plant Breeding.* Walter de gruyter (Eds), Berlin. — 1986. — P. 339–341.

80. Ryppy P. H. Haploidy in triticale // S. M. Jain, S. K. Sopory, R. E. Veilleux (Eds). *In vitro Haploid Production in Higher Plants*. — 1997. — Vol. 4. — P. 117–131.
81. Charmet G., Bernard S. Diallel analysis of androgenetic plant production in hexaploid triticale (X. *Triticosecale* Wittmack) // *Theor. Appl. Genet.* — 1984. — Vol. 69. — P. 55–61.
82. Tuveesson S., Ljunberg A., Johansson N., Karlsson K. E., Suns L. W., Losset J. P. Large-scale production of wheat and triticale double haploids through the use of a single anther culture // *Plant. Breed.* — 2000. — Vol. 119. — P. 455–459.
83. Ouyang J., Zhou S. M., Jia S. E. The response of anther culture to temperature in wheat // *Annu. Rep. Inst. Acad. Sinica, Taipei.* — 1980. — P. 69–70.
84. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. — М.: ФБК-Пресс, 1999. 152 с.
85. Szakacs E., Barnabas. Cytological aspects of *in vitro* androgenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Sex Plant Reprod.* — Vol. 1. — P. 217–222.
86. Agache S., Bachelier B., de Buyser I., Henry J., Snape J. W. Genetic analysis of anther culture response in wheat using aneuploid chromosome substitution and translocation line // *Theor. Appl. Genet.* — 1989. — Vol. 97. — P. 7–11.
87. Orlov P. A., Becker, Shwe G., Lorz H. Cytoplasmic effects on pollen embryogenesis induction in wheat microspore culture // *Cer. Res. Commun.* — 1999. — Vol. 27, № 4. — P. 357–363.
88. Zhou H., Konzak C. Genetic control of green regeneration from anther culture of wheat // *Genome.* — 1992. — Vol. 35, № 6. — P. 957–961.
89. Kondic A., Sesek S., Denic S. Genetic aspects of *in vitro* wheat anther culture // 9 *Inter. Wheat. Genet. Symp. Proced. Canada.* — 1998. — Vol. 3. — P. 195–197.
90. Torp A. M., Hansen A. L., Holme J. B., Andersen S. B. Genetic markers for haploid formation in wheat anther culture // 9 *Inter. Wheat. Genet. Symp. Proced. Canada.* — 1998. — Vol. 3. — P. 156–161.
91. Sagi E., Barnabas. Evidence for cytoplasmic control of *in vitro* microspore embryogenesis in the of wheat (*Tr. aestivum*) // *TAG.* — 1989. — Vol. 78, № 6. — P. 867–872.
92. Ekiz H., Konzak C. F. Nuclear and cytoplasmic control of anther culture of wheat. I Analysis of alloplasmic lines // *Crop Science.* — 1991. — Vol. 31, № 6. — P. 1427–1431.

93. Torp A. M., Hansen A. Z., Andersen S. B. Chromosomal regions associated with green plant regeneration in wheat (*Tr. aestivum* L.) anther culture // *Euphytica.* — 2001. — Vol. 119. — P. 377–387.
94. Орлов П. А., Маврищева Е. Б., Палилова А. П. Взаимодействие генома и плазмона при индукции морфогенетических реакций растений пшеницы в культуре пыльников // *Генетика.* — № 6. — С. 385–389.
95. Орлов П. А. Взаимодействие ядерных и цитоплазматических генов в детерминации развития растений. — Минск, 2001. — 170 с.
96. Szacacs E., Geza K., Jans P., Beata B. Substitution analysis of callus induction and plant regeneration from anther culture in wheat (*Tr. aestivum* L.) // *Plant Cell. Rep.* — 1988. — Vol. 7. — P. 127–129.
97. Palada-Nicolau M., Verzea M., Alionte Ch. Androgeneza experimentală la grîn, triticale și orez // *Cerc. Genet. Veg. Si anim.* — 1989. — Vol. 1. — P. 123–145.
98. Chen C C, Zin M H. Induction of rice plantlets from anther culture // *Bot. Bull Acad. Sinica.* — 1976. — Vol. 17. — P. 18–24.
99. Hu C., Huang S. C., Ho C. P., Liang H. C., Chuang C. C., Peng L. P. On the inductive conditions of rice pollen plantlets in anther culture // *Proceed. Symp. Plant Tissue Cult., Pitman Press, Boston.* — 1981. — P. 87–95.
100. Hu Chung, Liang Han-Hsing, Huang Shin Chou, Ho Ching-Po. An improved method of in paddy rice // *Proc. Symp. Anther Cult. Science Press, Peking.* — 1978. — Vol. 7. — P. 93–98.
101. Sun Z. X. Si H. M., Zhan X. J. Chen S. H. The effect of thermoperiod down plant growth on anther culture of Indica rice // C. B. Jou (Ed). *Biotechnology in Agriculture Proceed. First Asia – Pacific Conference on Agricultural Biotechnology, Beijing, China.* — 1992. — Vol. 15. — P. 361–364.
102. Ling D. H., Chen M. F., Ma Z. R., Liang C. J., Chen B. J. Anther culture of photoperiod sensitive genic male sterile rice // *Acta Bot. Sin.* — 1990. — Vol. 6. — P. 152–158.
103. Huang De-li, Zhao C. S., The effect of temperature on the frequency of albino plantlets in rice anther culture // Shen Jinhua (Ed). *Studies on Anther Cultured Breeding in rice.* — 1983. Agricultural Press, Beijing. — P. 106–109.
104. Barloy D., Beckert M. Improvement of the regeneration ability of androgenetic embryos by early anther transfer in maize // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* — 1993. — Vol. 33 — P. 45–50.

105. Mac Donald M. V. Donor plant growth factors affecting anther culture of maize and sweet corn (*Zea mays*) // *Ann. Bot.* — 1992. — Vol. 70. — P. 357–363.
106. Foroughi-Wehr B., Mix G. In vitro response of *Hordeum vulgare* L. anthers cultured from plants grown under different environments // *Environ. Exp. Bot.* — 1979. — Vol. 19. — P. 303–309.
107. Foroughi-Wehr B. Antherenkulturen von gerste und Roggen // *Biol. Bundesanst Land-Forstwirtschaft Jahresber.* — 1980: H 77.
108. Gaul H., Foroughi-Wehr B., Mix G., Willson H. M. Plants grain development of *Hordeum vulgare* // *Z. Pflanzenzucht.* — 1976. — Vol. 76. — P. 77–80.
109. Ouyang L. W., He D. G., Feng G. H., Jia S. E. The response of anther culture to temperature varies with growth conditions of anther-donor plants // *Plant Sci.* — 1987. — Vol. 49, № 2. — P. 237–244.
110. Hofman B., Kruger, Schuman G. In vitro androgenesis in wheat (*T. aestivum*) II. The influence of donor plant growth environment // *Archiv fur Zuch. Forsh.* — 1991. — Vol. 21, № 3. — P. 237–244.
111. Bjornstad A., Opsane-Ferstad H. G., Aasmo M. Effect of donor plant environment and light during incubation on anther culture some spring wheat (*T. aestivum*) cultivars // *Plant Cell and Organ Culture.* — 1989. — Vol. 17. — P. 27–37.
112. Piri K., Anceau C., Seilleur P. Amelioration des techniques androgeniques par modification des conditions de croissance des plantes donneuses d'antheres chez *T. aestivum* // *Bull. Rech. Agron. Gembloux.* — 1989. — Vol. 24, № 2. — P. 213–217.
113. Vasil I. K. Androgenetic haploids // *Intern. Rev. Cytol. Suppl.* 11a «Perspective in plant cell and tissue culture». — London, 1980. — P. 195–223.
114. Сагарова Т. Н. Андрогенез та ембріокультура у кукурудзи in vitro: Автореф. дис. ... докт. біол. наук: 03.00.20 / НАНУ Ін-т кл. біології та ген. — Київ, 2002. — 40 с.
115. Sunderland N., Dunwell. Anther and pollen culture // H. E. Street (Ed) *Plant Tissue and Cell Culture.* — 1977. Blackwell, Oxford. — P. 223–265.
116. Chenn C C. In vitro development of plants from microspores of rice // *In vitro.* — 1977. — Vol. 13. — P. 484–489.
117. Gosal S. S., A. S. Sindhu, Sandhu J. S., Sandhu-Gill, Baldev Singh. G. S. Khehra, G. S. Sidhu, H. S. Dhaliwal. Haploidy in rice //

- S. M. Jain, S. K. Sopory, R. E. Veilleux (Eds). *In Vitro Haploid Production in Higher Plants.* — 1997. — Vol. 4. — P. 1–35.
118. Kuo Chung-Shen, Lu Wenliang, Kui Jao-Lin. Corn (*Zea mays*): Productions of Pure Lines Through Anther Culture // *Biotechnology in Agriculture and Forestry 2.* — Crops 1. — Springer-Verlag, Berlin. — 1986. — P. 168–180.
119. Sunderland N. Anther and Pollen Culture. 1974–1979 // *The Plant Genome.* — Norwich, 1980. — P. 171–183.
120. Gaul H., Mix G., Foroughi-Wehr B., M. Okamoto. Pollen Grain Development of *Hordeum vulgare* // *Z. Pflanzenzucht.* — 1976. — Vol. 76. — P. 77–80.
121. Wang J J, Sun C, Wang C, Chien N. The induction of the pollen plantlets of Triticale and *Capsicum annum* from anther culture // *Sci. Sinica.* — 1973. — Vol. 16. — P. 147–151.
122. Внучкова В. А. Получение гаплоидов из пыльников тритикале и их цитологическая характеристика // *Доклады ВАСХНИЛ.* — 1979. — № 10. — С. 8–10.
123. Bernard S. In vitro androgenesis in hexaploid triticale: Determination of physical conditions increasing embryoid and green plant production // *Z. Pflanzenzucht.* — 1980. — Vol. 85. — P. 308–321.
124. He D. G., Ouyang J. W. Effect of stages of anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Ann. Rep. 1980. Inst. Gen. Acad. Sinica. Taipei.* — 1981. — P. 74–75.
125. Rashid A. Pollen dimorphism in relation to pollen plant formation // *Physiol. Plant.* — 1983. — Vol. 58. — P. 544–548.
126. He D. G., Ouyang J. W. Callus and plant formation from cultured wheat anthers at different developmental stages // *Plant Sci. Lett.* — 1984. — Vol. 33. — P. 71–79.
127. Vasil J., Nitsch C. Experimental production of pollen haploids and their uses // *Z. Pflanzenphysiol.* — 1975. — Vol. 76, № 3. — P. 191–212.
128. Nitsch C. Culture of isolated microspores // *Appl. And Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* Springer-Verlag, Berlin. — 1977. — P. 268–278.
129. Nitsch C., Andersen, M. Godard, Neuffer M. G., Sheridan W. F. Production of haploid plants of *Zea mays* and *Pennisetum* through androgenesis // *Regeneration of plant from cell and tissue culture and genetic variability. Proceed. C.N.R.S. — N.S.F. Workshop, Orsay 1980, France.* — 1981. — P. 141–145.

130. Sunderland N. Strategies in the improvement of yields in anther culture // Proc. Symp. Plant Tissue Cult. Science Press, Peking. — 1978. — P. 65–86.
131. Huang B., Sunderland N. Temperature-stress pretreatment in barley anther culture // Ann. Bot. — 1982. — Vol. 49. — P. 77–88.
132. Tsay H. S., Miao S. H., Widholm J. M. Factors affecting haploid plant regeneration from maize anther culture // J. Plant Physiol. — 1986. — Vol. 126. — P. 33–40.
133. Sun J. S., Shu Z. G., Wang J. J., Tigerstedt P. M. Studies on the anther culture of Triticale // Proc. Fourth John Innes Symp. The Plant Genome. Norwich, England. — 1980. — P. 243–244.
134. Дьячук Т. И., Дьячук П. А. Методические рекомендации по получению гаплоидных растений мягкой пшеницы в культуре пыльников. — Москва, 1989. — 36 с.
135. Nitsch C. Pollen culture — a new technique for mass production of haploid and homozygous plant // K. Kasha (Ed). Haploid in Higher Plants. Advances and potential. Guelph. — 1974. — P. 123–135.
136. Wilson H. M., Mix G., Foroughi-Wehr B. Early microspore division and subsequent formation of microspore calluses at high frequency in anther of *Hordeum vulgare* L. // J. Exp. Bot. — 1978. — Vol. 29. — P. 227–238.
137. Sathish P., Gamborg O. L., Nabors M. W. Rice anther culture: callus initiation and androclonal variation in progenies plants // Plant Cell Rep. — 1995. — Vol. 14. — P. 432–436.
138. Zapata F. J., Torrino L. B. Heat treatment to increase callus induction efficiency in anther culture of IR 42 // Intl. Rice Res. Newsl. — 1986. — Vol. 11. — P. 25–26.
139. Schmid J. E., Keller E. R. Effect of a gametocid on the induction of haploids in *Triticum aestivum* // W. Horn, C. J. Jensen, W. Odenbach, O. Schieder (Eds). Proc. Int. Symp. Eucarpia, Sept. Berlin. De Gruyter. — 1986. — P. 347–349.
140. Picard E., Hours C., Gregoire S., Phan T. H., Meunier J. P. Significant impact of androgenetic haploid and double haploid induction from wheat plants treated with a chemical hybridisation agent // Theor. And Appl. Genet. — 1987. — Vol. 74, 3. — P. 289–297.
141. Zhang L. J., Anceau C., Lepoivre P., Seilleur P., Semal J. An efficient method for the regeneration of wheat (*Tr. aestivum* L.) from anther cultures // Bull. Rech. Agron. Gembloux. — 1987. — Vol. 22, № 4. — P. 301–314.
142. Круглова Н. Н. Морфогенез в культуре пыльников пшеницы: эмбриологический подход. — Уфа: Гилем, 2001. — 202 с.
143. Белінська О. В. Генотипові особливості індукції гаплоїдів ячменю (*H. vulgare* L.) методи культури пиляків in vitro: Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.15 / Держ. універ. — Харків, 1997. — 18 с.
144. Zapata F. J., Torrizo L. B., Ramero R. D., Alejar M. S. Androgenesis in *Oryza sativa* // A. Fujivar (Ed). Plant tissue culture. Maruzen, Tokyo. — 1982. — P. 531–532.
145. Wang C. C., Sun C. S., Chu C. S., Wu S. C. Studies on the albino pollen plantlets of rice // Proc. Symp. Plant Tissue Cult. Science Press, Peking. — 1978. — P. 149–160.
146. Pan C., Pais S., Ju H. Certain factors affecting the frequency of induction of wheat (*Tr. vulgare*) pollen plants // Acta Bot. Sinica. — 1975. — Vol. 17, № 2. — P. 161–166.
147. Butter B., Schmid J. E., Stang P. Effect of L-proline and post-plating temperature treatment on maize (*Zea mays* L.) anther culture // Plant Cell Rep. — 1991. — Vol. 10. — P. 325–328.
148. Sorvari S., Schider O. Influence of sucrose and melibiose on barley anther culture in starch media // J. Plant Breeding. — 1987. — Vol. 99. — P. 161–171.
149. Finnie S. J., Powell W., Dyer A. F. The effect of carbohydrate composition and concentration on anther culture response in barley (*Hordeum vulgare* L.) // Plant Breeding. — 1989. — Vol. 103. — P. 110–118.
150. Kao K. N. Plant formation from barley anther cultures with ficoll media // Z. Pflanzenphysiol. — 1981. — Bd 103. — S. 437–443.
151. Daniell G. The effect of anther orientation on callus formation and plant regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.) // Bayerische Landesanstalt für Boden Kultur und Pflanzenbau, Freising. — München, German Fed. Republ. — 1987. — Vol. 64, № 7. — P. 863–871.
152. Zhi-Hong, Huang B., Sunderland N. Recent advances in barley anther culture // 4-th Intern. Barley Gen. Symp. July. Edinburg. — 1981. — P. 137.
153. Willson H. M. Culture of whole barley spikes stimulates high frequencies of pollen calluses in individual anthers // Plant Sci. Lett. — 1977. — Vol. 9. — P. 233–238.
154. Zenktele, Stefaniak. B. Induction of androgenesis in anthers of *Hordeum vulgare* L. cultured in vitro on leaves and calluses // Plant Sci. Lett. — 1982. — Vol. 26. — P. 219–225.

155. Zhi-Hong Xu, Huang B. Anther factors in barley anther culture // *Acta Bot. Sin.* — 1983. — Vol. 26, № 1. — P. 1–10.
156. Nitsch J. P. Experimental androgenesis in *Nicotiana* // *Phytomorphology*. — 1986. — Vol. 19. — P. 389–403.
157. Xu L., Jia S. Effect of sugar pretreatment on enhancing induction frequency of anther culture in maize // *Hereditas*. — 1979. — Vol. 1. — P. 30–31.
158. Chu C C. The N-6 medium and its application to anther culture of cereal crops // *Proc. Symp. Plant Tissue Cult.*, Science Press., Peking. — 1978. — P. 45–50.
159. Blaydes D. T. Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean tissue // *Physiol. Plantarum*. — 1966. — Vol. 19. — P. 748–758.
160. Anonymous. A sharp increase of the frequency of pollen plant induction in wheat with potato medium // *Acta Genet. Sinica*. — 1976. — Vol. 3. — P. 25–31.
161. Chuang C C., Ouyang T. W., Chia H., Chou S. M., Ching C. K. A set of potato medium for wheat anther culture // *Proceed. Symp. Plant Tissue Cult.* Science Press., Peking. — 1978. — P. 51–56.
162. Linsmaer E. M., Skoog F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture // *Physiol. Plantarum*. — 1965. — Vol. 18. — P. 100–127.
163. Gamborg O., Eveleigh D. E. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley // *Can. J. Biochem.* — 1968. — Vol. 46. — P. 417–421.
164. Chaleff R. S., Stolarz A. Factors influencing the frequency of callus formation among cultured rice (*Oryza sativa*) anthers // *Physiol. Plantarum*. — 1981. — Vol. 51. — P. 201–206.
165. Jang X. R., Wang J. R., Li H. L., Li J. E. Studies on the general medium for anther culture of cereals and increasing of frequency of green pollen plantlets — induction of *Oryza sativa* anther // *Acta Phytophysiol. Sin.* — 1980. — Vol. 6. — P. 67–74.
166. Raina S. K., Sathish P., Sarma K. S. Plant regeneration from in vitro cultures of anthers and mature seed of rice *Oryza sativa* L. cv. Basmati-370 // *Plant Cell. Rep.* — 1987. — Vol. 6. — P. 43–45.
167. Raina S. K., Balachandran S. M., Virmani S.S., Japata F. J. Improved medium for efficient anther culture of some Indica rice haploids // *Intl. Rice Res. Newsl.* — 1989. — Vol. 14. — P. 4.
168. Rout J. R., Sharma N. P., Rao G. J. N. Effect of potato-2 medium on anther culture of interspecific rice hybrids // *Ann. Bot.* — 1989. — Vol. 63. — P. 621–624.
169. Zapata F. J., Alejar M. S., Torriso A. U., Singh V. P. Field performance of anther-culture-derived lines from F1 crosses of Indica rices under saline and nonsaline conditions // *Theor. Appl. Genet.* — 1991. — Vol. 83. — P. 6–11.
170. Shahjahan A. K. M., Karim N. H., Miah S. A. Culture conditions and callus forming ability of rice anthers // *Intl. Rice. Newsl.* — 1985. — Vol. 10. — P. 22.
171. Белинская Е. В., Монзюк В. Т., Анцыферова А. Г., Наумов А. Г. Технология получения андрогенных гаплоидов и ее использование в селекции ярового ячменя // *Молекулярные механизмы генетических процессов; биотехнология: Межд. симп. Москва, Минск.* — 2001. — С. 216–217.
172. Lin G. S., Zhou S. Y., Wang Z. G. Studies on the method for direct induction of pollen plants from rice anther culture // *Acta Phytophysiol. Sin.* — 1984. — Vol. 10. — P. 285–289.
173. Hirabayashi T., Misoo S., Kamijima O. I., Savano M. Effect of various amino acids and casein hydrolysate on anther culture of rice (*Oryza sativa* L.) // *Sci. Reports of Faculty of Agriculture, Kobe Univ. Japan.* — 1992. — Vol. 30. — P. 23–29.
174. Chen C C., Lin M H. Genetic analysis of culture-derived plants of rice // *J. Hered.* — 1982. — Vol. 73. — P. 49–52.
175. Brettel R. I., Thomas E., Wernicke. Production of haploid maize plants by anther culture // *Maydica*. — 1981. — Vol. 26. — P. 101–111.
176. Genovesi A. D. Maize (*Zea mays* L.). In vitro production of haploids // *Biotechnology in Agriculture and Forestry 12: Haploids in Crop Improvement I*, Springer-Verlag, Berlin. — 1990. — P. 176–203.
177. Hangehang M., Liang G. H., Wasson C. F. Effects of growth regulators and genotypes on callus and embryoid induction from maize anther culture // *Plant Breed.* — 1991. — Vol. 106. — P. 47–52.
178. Dieu P., Beckert M. Further studies of androgenetic embryo production and plant regeneration from in vitro cultured anthers of maize (*Zea mays* L.) // *Maydica*. — 1986. — Vol. 31. — P. 245–259.
179. Ku M. K., Cheng W. C., Juo L. C., Kuan J. L., An H. P., Huang C. H. Induction factors and morpho-cytological characteristics of pollen derived plants in maize (*Zea mays* L.) // *Proc. Symp. Plant Tissue Culture*, Science Press, Peking. — 1978. — P. 35–42.
180. Powell W., Borrino E. M., Allison M. J., Griffith D. W., Asher M. J., Dunwell J. M. Genetical analysis of microspore-derived plants of barley (*Hordeum vulgare*) // *Theor. Appl. Genet.* — 1986. — Vol. 72. — P. 619–626.

181. Huang De-li, Zhao C. S. The effect of temperature on the frequency of albino plantlets in rice anther culture // S. Jin H. et.al. (Eds). Studies on anther cultured breeding in rice. Agric. Press, Beijing. — 1983. — P. 106–109.
182. Hu Z. H., Sunderland U. N. Culture of barley anthers in conditioned // J. Exp. Bot. — 1981. — Vol. 32. — P. 767–778.
183. Hu Z. H. Inoculation density in the culture of barley anthers // Sci. Sin. — B. 25. — P. 961–968.
184. Круглова Н. Н., Батыгина Т. Б. Методические рекомендации по использованию морфогенетического потенциала пыльника в биотехнологических исследованиях яровой мягкой пшеницы. — Уфа: ИБ УНЦ РАН, 2002. — 22 с.
185. Hunter C. P. European Patent Application by Shell International Research Maatschappij B. V. 977200773.7. — 1987.
186. Sopory S. K., Munshi M. Anther culture // S. M. Jain, S. K. Sopory, Veilleux (Eds). In Vitro Haploid Production in Higher Plants, Kluwer Academic Publishers. — 1996. — Vol. 1. — P. 145–176.
187. Kao Michayluk. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media // Planta. — 1975. — Vol. 126. — P. 105–110.
188. Miller C. O. Kinetin and kinetin-like compounds // Mod. Meth. Pflanzenanal. — 1963. — Vol. 6, № 6. — P. 194–202.
189. Darvey N. L., Fazal J. A., Barbera F., Anara G. A modified anther culture methodology for increasing embryoid production in wheat and triticale // Proceed. Second Intern. Triticale Symp., Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brazil 1–5. Oc. 1990. — 1991. CIMMJT, Mexico. D. F. — P. 314–319.
190. Wang X., Hu H. The effect of potato II medium for triticale anther culture // Plant Sci. Lett. — 1984. — Vol. 36. — P. 237–239.
191. Wang P., Chen Y. Preliminary study on prediction of height of pollen  $H_2$  generation of winter wheat grown in the field // Acta Agronom. Sin. — 1983. — Vol. 9. — P. 283–284.
192. Marciniak K., Banaszak L., Wedzony M. Effect of Genotype, Medium and Sugar on Triticale (*Triticosecale* Wittm.) Anther Culture Response. — Cer. Res. Commun. — 1998. — Vol. 26, № 2. — P. 145–152.
193. Bernard S., Charmet G. Improvement of haploid production through in vitro anther culture in hexaploid triticale // Genetics and breeding of Triticale, EUCARPYA Meeting, Clermont — Ferrand (France) 1984. In RA, Paris. — 1985. — P. 306–316.
194. Gonzalaz I., Jouve N. Improvement of Anther Culture Media for Haploid Production in Triticale // Cer. Res Commun. — 2000. — Vol. 28, № 1–2. — P. 65–72.
195. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // Physiol. Plantarum: 1962. — Vol. 15. — P. 473–497.
196. Wang P., Chen J. R. Effects of growth conditions of anther-donor plants on the productions of pollen plants in wheat anther culture // Acta Genet. Sinica. — 1980. — Vol. 1. — P. 64–71.
197. Henry J., Buysier de J. Float culture of wheat anthers // Theor. Appl. Genet. — 1981. — Vol. 60. — P. 77–79.
198. Liu C H, Hu H. High frequency of androgenesis in wheat (*Triticum aestivum*) // Genet. Manip. Plants. — 1989. — Vol. 5(2). — P. 24–28.
199. Liang G., Hu A., Hoang-Tang. Direct regeneration of wheat haploids via anther culture // Crop. Sci. — 1987. — Vol. 27, 2. — P. 336–339.
200. Parisi L., Picard E. Disease response of doubled haploid lines and their original cultivars in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Z. Planthenzuchtg. — 1986. — Vol. 96. — P. 63–68.
201. Last D. I., Brettel R. I. S. Embryo yield in wheat anther culture is influenced by choice of sugar in the culture medium // Plant Cell Rep. — 1990. — Vol. 9. — P. 14–16.
202. Васильев С. В. Изучение закономерностей получения дигаплоидных растений пшеницы для создания нового селекционного материала: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 06.01.05. — Новосибирск, 1996. — 16 с.
203. Ислам М. Создание и селекционно-генетическая оценка гомозиготных линий пшеницы, полученных в культуре пыльников: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 05.01.05. — Краснодар, 1995. — 24 с.
204. Chaleff R. S. Innovative approaches to rice breeding // Tissue Culture in Rice Improvement: An Overview, IRRI, Manila. — 1980. — P. 81–91.
205. Aruna M., Reddy G. M. Genotypic differences in callus initiation and plant regeneration from anthers of Indica rice. //Cur. Sci. — 1988. — Vol. 57. — P. 1014–1017.
206. Tsay H. S., Chen L. H., Tseng T. H., Lai P. C. The culture of rice anthers of Japonica x Indica crosses //A. Fujivara (Ed). Plant Tissue Culture, Maruzen Co. Ltd., Tokyo. — 1982. — P. 561–562.
207. Kao K. N., Saleem M., Abrams S., Pedras M., Horn D., Mallard C. Culture conditions for induction of green plants from barley mi-

- crospores by anther culture method. // *Plant Cell Reports*. — 1991. — Vol. 9, № 11. — P. 595–601.
208. Day A., Ellis T. H. N. Detected forms of plastid DNA in albino plants from cereal anther culture // *Cur. Genet.* — 1985. — Vol. 9. — P. 671–678.
209. Andersen S. B., Due J. L., Olsen A. The response of anther culture in a genetically wide material of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Plant Breed.* — 1987. — Vol. 99. — P. 181–186.
210. Chen C, Chen C M/ Chromosome number changes in microspore callus of rice during successive subcultures // *Can. J. Genet.* — 1980. — Vol. 22. — P. 607–614.
211. Ku Ming-Kuang, Cheng W. C., Juo L. S., Kuan J. L., An H. P., Huang C. H. Induction factors and morpho-cytological characteristics of pollen derived plants in maize (*Zea mays* L.) // *Proc. Symp. Plant Tissue Culture*. Science Press, Peking. — 1978. — P. 35–42.
212. Devaux P. Comparison of anther culture and *Hordeum bulbosum* method for the production of doubled haploid in winter barley. II Variation of chromosome number and seed setting the progeny // *Plant Breeding*. — 1988. — Vol. 100. — P. 181–187.
213. Bouharmont J. Cytology of microspores and calli anther culture in *Hordeum vulgare* // *Caryologia*. — 1977. — Vol. 30. — P. 351–360.
214. Zianddin A., Simon E., Kasha K. J. Improved plant regeneration from microspore culture in barley (*Hordeum vulgare* L.) C. V. Igrı // *Plant Cell Reports*. — 1991. — Vol. 9, № 2. — P. 69–72.
215. Pohler W., Schuman G., Sulze M. Cytological investigation in callus tissue and regenerated plants from *Triticale* anther culture // *Plant Cell Reports*. — 1988. — Vol. 5. — P. 302–310.
216. Henry j., De Buyser J. Androgenese sur des Blestender (*Triticum aestivum* L.) en cours de selection. 3. Electrophorese des gliadines de quelques haploids doubles // *Z. Pflanzenzuecht.* — 1980. — Vol. 85. — P. 322–327.
217. Morris R., Sears E. R. The cytogenetics of wheat and its relatives // Quisenberry K. S., Reitz L. P. (Eds). *Wheat and wheat improvement*. Am. Soc. Agron., Madison. Wisc. — 1967. — P. 19–88.
218. Zeng J., Ouyang J. The early androgenesis in vitro wheat anthers under ordinary and low temperature // *Acta Genet. Sinica*. — 1980. — Vol. 7. — P. 165–173.
219. Martinat J. P., Bernard M. Genetic characterization of storage proteins in a set of F1 derived haploid lines in bread wheat // *Theor. Appl. Genet.* — 1996. — Vol. 92. — P. 340–346.
220. Chen J., Li L. T. Investigation and utilization of pollen-derived haploid plants in rice and wheat // *Proc. Symp. Plant Tissue Cult.* Science Press. Peking. — 1978. — P. 199–211.
221. Pauk J., Kertesz L., Beke B., Bona L., Csosz M., Matuz J. New Winter Wheat Variety: «GK Delibab» Developed via Combining Conventional Breeding and In Vitro Androgenesis // *Cer. Res. Commun.* — 1995. — Vol. 23, № 3. — P. 251–256.
222. Hu Han. Crop improvement by anther culture // *Abstracts of contrib. papers. Part II. Int. Congress Genetics, New Delhi, dec. 1983.* New Delhi. — 1983. P. 121–122.
223. Литвиненко М. А. Биотехнологічні методи у селекції сільськогосподарських культур // *Вісник аграрної науки*. — 2010. — № 6. — С. 11–14.
224. Devaux P., Zivi M., Kilian A., Kleinhofs A. Doubled haploids in barley // *Proc. Canad. Barley Sympos. Ses 7b. Suckaton.* — 1999. — P. 213–220.
225. De Buyser J., Henry J., Lonnet P., Hertzog R., Hespel A. Florin: A Doubled Haploid Wheat Variety Developed by the Anther Culture Method // *Plant Breeding*. — 1987. — Vol. 98. — P. 53–56.
226. Davies D. The embryo cultures of interspecific hybrids of *Hordeum* // *New. Phytol.* — 1960. — Vol. 59, № 2. — P. 9–14.
227. Ho K. M. Genetic control chromosome elimination in interspecific hybrids leading to haploid formation in barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Ph. D. Thesis Univ. of Guelph, Ontario*. — 1973.
228. Subrahmanyam N. C. Interspecific hybridization chromosome elimination and haploidy in *Hordeum* // *Barley Genet. Newslett.* — 1976. — Vol. 6. — P. 69–70.
229. Ho K. M., Kasha K. J. Genetic control of chromosomal elimination during haploid formation in barley // *Genetics*. — 1975. — Vol. 31. — P. 263–275.
230. Бояджиев П. Мариана, сорт ориз, получен по метода на антерните култури // *Растениед. науки*. — 1990. — № 6. — С. 111–113.
231. Kasha K. J. Haploid from somatic cells // *Haploids in Higher Plants Proc. Int. Symp. Univ. Guelph*. — 1974. — P. 67–87.
232. Simpson E., Snape J. W. Haploid production in *Hordeum spontaneum* x *H. bulbosum* crosses // *Barley Genet. Newslett.* — 1980. — Vol. 10. — P. 66–67.
233. Reinert J., Bajaj Y. P. S. Anther cultures haploid production and its significance. — In: *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell*,

- Tissue and Organ Culture. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York, 1977, p. 251–267.
234. Simpson E., Snape J. W., Finch R. A. Variation between *Hordeum bulbosum* genotypes in their ability to produce haploids of barley *Hordeum vulgare* // *Z. Pflanzenzuecht.* — 1980. — Vol. 85. — P. 205–211.
  235. Дьячук Т. И. Технологические и селекционные аспекты гаплоидии: Автореф. дисс. ... доктора биол. наук: 06.01.05 / Саратов. НИИ с/х Юго-Востока. — Саратов, 2003. — 49 с.
  236. Jensen C. I. Monoploid Production by Chromosome Elimination // *Appl. Fund. Asp. of Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* Springer-Verlag. — 1977. — P. 299–339.
  237. Barclay J. B. High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) by chromosome elimination // *Nature (London).* — 1975. — Vol. 256. — P. 410–411.
  238. Snape J. W., Chapman V., Moss J., Blanchard C. E., Miller T. E. The crossabilities of wheat varieties with *Hordeum bulbosum* // *Heredity.* — 1979. — Vol. 42. — P. 291–298.
  239. Слєпченко А. И., Лукьянюк С. Ф. Получение гаплоидов пшеницы с помощью гаплопродюсера *Hordeum bulbosum* // *Методы биотехнологии в селекции сельскохозяйственных растений: Сб. науч. тр. СГИ.* — Одесса, 1992. — С. 13–16.
  240. Жосонар М. В. Оптимізація технології отримання подвоєних гаплоїдів генотипів м'якої пшениці, що різняться за генами фотоперіодичної чутливості ( *Rpd* ) та тривалості яровизації (*Vrd*). Автореф. дис. ... канд. біол. наук. 03.00.20 біотехнологія / Держ. універ. — Одеса, 2009. — 20 с.
  241. Ігнатова С. О., Жосонар М. В., Лобанова К. І., Шестопап О. Л. Отримання подвоєних гаплоїдів м'якої пшениці в культурі пиляків: Методичні рекомендації. — Одеса, 2008. — 12 с.
  242. Kruse A. Intergenic hybrids between *Hordeum vulgare* (L. *Distichium* v. *Pollas*  $2n = 14$ ) and *Secale cereale* L. (v. *Petcus*  $2n = 14$ ) // *Kal. Vet. Landb. Arsskr.* — 1967. — P. 82–92.
  243. Fedak G. Haploids from barley x rye cross // *J. Genet. And Cytol.* — 1977. — Vol. 19, № 1. — P. 15–19.
  244. Fedak G. Barley // *Encyclopedia of Agricultural Sci.* Academic Press. — 1994. — Vol. 1. — P. 233–251.
  245. Шумный В. К., Першина Л. А., Белова Л. И. Получение ячменно-ржаных гибридов на основе культурных сортов ячменя // *Цитология и генетика.* — 1982. — Т. 16, № 3. — С. 46–50.
  246. Bates L. S., Deyoc C. W. Wide hybridization and cereal improvement // *Econom. Bot.* — 1973. — Vol. 27. — P. 401–403.
  247. Riera-Lizarazu O., Mujeeb-Kazi A. Polyhaploid production in the Triticale: Wheat x *Tripsacum* crosses // *Crop Sci. Soc. America.* — 1961. — Sept. — Oct. 1993. — Vol. 33(5). — P. 973–976.
  248. Suenaga K., Morshedi, Darvey N. L. Evaluation of teosinte lines as pollen parents for wheat haploid production // *Cer. Res. Comun.* — 1998. — Vol. 26, № 2. — P. 119–125.
  249. Laurie D. A., Bennet M. D. Wheat x maize hybridization // *Can. J. Genet. Cytol.* — 1986. — Vol. 28. — P. 313–316.
  250. Лобанова К. И. Регенерація рослин в культурі пиляків м'якої пшениці, шляхи її підвищення: Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.20 / Одеськ. нац. універс. — Одеса, 2009. — 19 с.
  251. Laurie D. A. factors affecting fertilization frequency in crosses of *Triticum aestivum* c.v. *Highbury* x *Zea mays*. C.v. *Seneca 60.* // *Plant Breeding.* — 1989. — Vol. 103. — P. 133–140.
  252. Lefebre D., Devaux P. Double haploid of wheat from wheat x maize crosses: genotype influence fertility and heritance of the 1BL — 1RS chromosome // *Theor. Appl. Genet.* — 1996. — Vol. 93. — P. 1267–1273.
  253. Inagaki M. N., Nagamine T., Mujeeb-Kazi A. Use of pollen storage and deteached — tiller culture in wheat polyhaploid production through wide crosses // *Cer. Res. Commun.* — 1997. — Vol. 25. — P. 7–11.
  254. Laurie D. A., Remondie S. High frequencies of fertilisation and haploid seedling production in crosses between commercial hexaploid wheat varieties and maize // *Plant. Breed.* — 1991. — Vol. 106. — P. 182–189.
  255. Zhang J., Friebe B., Raupp W. J., Harrison S. A., Gill B. S. Wheat embryogenesis and haploid production in wheat x maize hybrids // *Euphytica.* — 1996. — Vol. 90. — P. 315–324.
  256. Laurie D. A., Snape J. W. The agronomic performance of wheat doubled haploid lines derived from wheat x maize crosses // *TAG.* — 1990. — Vol. 79, № 6. — P. 813–816.
  257. Kisana N. S., Nkongolo K. K., Quick J. S., Johnson D. L. Production of doubled haploids by anther culture and wheat x maize method in a wheat breeding programme // *Plant Breeding. Zeitschrift fur Pflanzen.* Berlin. — 1993. — Vol. 110, № 2. — P. 96–102.
  258. Chercaoui S., Lamsaouri O., Chlyan A., Chlyan H. Durum wheat x maize crosses for haploid wheat production: Influence of parental

- genotypes and various experimental factors // Plant Breed. — 2000. — Vol. 119. — P. 31–36.
259. Эмбриология растений. — М.: Агропромиздат, 1990. — Т. 2. — 463 с.
260. Цидин Н. В. Теория и практика отдаленной гибридизации. — М.: Наука, 1981. — 160 с.
261. Замбрборщ І. С. Генетичне поліпшення сегреґуючих популяцій зі здатності до ембріогенезу *in vitro* у культурі пиляків та соматичних тканин кукурудзи: Автореф. дис. ... канд. біол. наук 03.00.15 / СГІ. — Одеса, 2002. — 19 с.
262. Kodali S., Khana V. K. Standardization of the best timing of growth hormone application in wheat-barley crosses to increase seed set // Ser. Res. Commun. — 1979 — Vol. 22, № 4. — P. 309–313.
263. Круглова Н. Н., Батыгина Т. Б., Горбунова В. Ю., Титова Г. Е., Сельдиминова О. А. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы. — М.: Наука, 2005. — 99 с.
264. Батыгина Т. Б., Круглова Н. Н., Горбунова В. Ю., Титова Г. Е., Сельдиминова О. А. От микроспоры — к сорту. — М.: Наука, 2010. — 173.
265. Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А., Максимов Н. Г., Максимова В. И., Шеремет А. М. Использование эмбриокультуры при отдаленных скрещиваниях пшеницы и ячменя с рожью // С/х биология. — 1981. — Т. 16, № 5. — С. 735–739.
266. Столярова С. В. Культура тканей при межвидовой гибридизации пшеницы: Автореф. дис. ... канд. с/х наук: 06.04.05 / Ин-т с/х Юго-Востока. — Саратов, 1998. — 18 с.
267. Knox R. E., Clarke J. M., De Pauw R. M. Dicamba and growth condition effects on doubled haploid production in durum wheat crossed with maize // Plant Breed. — 2000. — Vol. 119. — P. 289–298.
268. Laibach F. Ds Taubwerden von Bastardsamen und die Kunstliche Aufzucht früh Absterbender Bastard Embryogen // Z. Bot. — 1925. — Bd 17. — P. 417–459.
269. Ивановская Е. В. Культура гибридных зародышей злаков на искусственной среде // ДАН СССР. — 1946. — Т. 54, № 5. — С. 449–452.
270. Орлова И. Н. Цитологические и эмбриологические основы отдаленной гибридизации пшеницы: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.05 / ВИР. — Ленинград, 1990. — 33 с.
271. Першина Л. А. Отдаленная гибридизация ячменя (генетические и биотехнологические аспекты): Автореф. дис. ... д-ра биол.

- наук: 03.00.15 / Ин-т Цитологии и генетики. — Новосибирск, 1995. — 35 с.
272. White P. R. The cultivation of animal and plant cell // Ronald Press, New York. — 1954.
273. Norstog K. Synthetic medium for the culture of premature barley embryos // In vitro. — 1973. — Vol. 8, № 4. — P. 307–308.
274. Прилюк Л. В. Получение и микроразмножение гибридов между пшеницами-однозернянками, эгилопсами и рожью // Роль отдаленной гибридизации в эволюции и селекции пшеницы: Всесоюз. совещ. — Тбилиси, 1985. — С. 35–36.
275. Суриков И. М., Киссель Н. И. Гибридизация ячменя *Hordeum vulgare* с пшеницей *Triticum aestivum* L. и *T. Timopheevi* Zhuk // Роль отдаленной гибридизации в эволюции и селекции пшеницы. Всесоюз. совещ. — Тбилиси, 1985. — С. 47–48.
276. Cox T. S., Sears R. G., Bequette R. K. Use of winter wheat x *Triticum tauschii* backcross populations for germplasm evaluation // Theor. Appl. Genet. — 1995. — Vol. 90. — P. 571–577.
277. Cox T. S., Hatchett J. H., Gill B. S., Raupp w. J., Sears R. G. Agronomic performance of hexaploid lines derived from direct crosses between wheat and *Aegilops squarrosa* // Plant Breed. — 1990. — Vol. 105. — P. 271–277.
278. Cox T. S., Sears R. G., Bequette R. K., Martin T. J. Germplasm Enhancement in Winter Wheat x *Triticum tauschii* Backcross Populations // Crop Sci. — 1995. — Vol. 35, № 3. — P. 913–919.
279. Gill B. S., Raupp W. J. Direct genetic transfers from *Aegilops squarrosa* L. to hexaploid wheat // Crop Sci. — 1987. — Vol. 27. — P. 445–450.
280. Fritz A. K., Cox T. S., Gill B. S., Sears R. G. Molecular Marker-Facilitated Analysis of Introgression in Winter Wheat x *Triticum tauschii* Population // Crop. Sci. — 1995. — Vol. 35. — P. 1691–1695.
281. Larkin P. J. Somaclonal variation: history, method and meaning // Iowa State I. Res. — 1987. — Vol. 61, № 4. — P. 393–434.
282. Муромцев Г. С., Бутенко Р. Г., Тихоненко Т. И., Прокофьев М. И. Основы сельскохозяйственной биотехнологии. — М.: Агропромиздат, 1990. — 383 с.
283. Скаукрофт У. Р. Соматическая изменчивость: миф о клональном единообразии // Мобильность генома растений. — М.: Агропромиздат, 1990. — С. 228–260.
284. Skirvin R. M. Natural and Induced Variation in Tissue Culture // Euphytica. — 1978. — Vol. 27. — P. 241–266.

285. Bayliss M. W. Chromosomal variation in plant tissue culture // *Int. Rev. Cytol.* — 1980. — Vol. 11a. — P. 113–143.
286. Фролова Л. В. Цитогенетическая изменчивость и автоселекция растительных клеток в условиях *in vitro* // *Биотехнология.* — М.: Наука, 1984. — С. 272–277.
287. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений // *Биополимеры и клетка.* — 1994. — Т. 10, № 6. — С. 5–35.
288. Negruk V. L., Eisner G. J., Redichkina T. D., Dumanskaya N. N., Cherny D. L., Alexandrov A. A., Shemyakin M. F., Butenko R. G. Diversity of *Vicia faba* circular mt DNA in whole plants and suspension cultures // *Tag.* — 1986. — Vol. 72. — P. 541–547.
289. Mohan Jain S. Tissue Culture — derived variation in crop improvement // *Euphytica.* — 2001. — Vol. 18. — P. 153–166.
290. Larkin P. J., Scowcroft W. R. Somaclonal variations — a novel source of variability from cell culture for plant improvement // *Theor. Appl. Genet.* — 1981. — Vol. 60. — P. 197–214.
291. Evans D. A. Somaclonal and gametoclonal variation / *Biotechnology in Tropical Crop Improvement* // *Proc. Int. Biot. Workshop 1987.* ICRISAT Center, Indica. — 1988. — P. 57–66.
292. Shepard J. F. The regeneration of potato from leaf cell protoplasts // *Sci. Amer.* — 1982. — Vol. 246. — P. 154–166.
293. Evans D. A., Sharp W. R. Somaclonal variation in agriculture // *Biotechnology.* — 1986. — Vol. 4. — P. 528–532.
294. Gengenbach B. G., Connely J. A., Pring D. R., Conde M. F. Mitochondrial DNA variation in maize plant regenerated during tissue culture selection // *Theor. Appl. Genet.* — 1981. — Vol. 59. — P. 161–167.
295. Evans D. A., Sharp W. R. Single gene mutation in tomato plants regenerated from tissue culture // *Science.* — 1983. — Vol. 221. — P. 949–951.
296. Глеба Д. М., Глеба Ю. Ю. Мутации и эпигенетические изменения в культуре клеток и протопластов высших растений // *Цитология и генетика.* — 1978. — № 12. — С. 458–469.
297. Scowcroft W. R., Ryan S. A., Brettell R. I.S, Larkin P. J. Somaclonal variation in crop plants // *CSIRO Division of Plant Industry. Report 1983–1984.* Canberra Australia. — 1984. — P. 12–19.
298. Lee M., Phillips R. L. Genome rearrangement in maize induced by tissue culture // *Genome.* — 1987. — Vol. 29. — P. 122–128.
299. Ryan S. A., Larkin S. A., Ellison F. W. Somaclonal variation in some agronomic and quality characters in wheat // *Theor. Appl. Genet.* — 1987. — Vol. 74. — P. 77–82.
300. Orton T. J. Spontaneous electrophoretic and chromosomal variability in callus cultures and regenerated plants of celery // *Theor. Appl. Genet.* — 1983. — Vol. 67. — P. 17–24.
301. Oono K. Test tube breeding of rice by tissue culture // *Trop. Agr. Res.* — 1978. Series II. — P. 109–123.
302. Zheng Kang-Le, Zhou Zong-Ming, Wang Guo-Liang, Luo Ju-Kun, Xiong Zhen-Min. Somatic cell culture of rice cultivars with different grain types: Somaclonal variation in some grain and quality characters // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* — 1989. — Vol. 18. — P. 201–208.
303. Shepard J. F., Bidney D., Shahin E. Potato protoplasts in crop improvement // *Science.* — 1980. — Vol. 208. — P. 17–24.
304. Secor G. A., Shepard J. F. Variability of protoplasts — derived potato clones // *Crop. Sci.* — 1987. — Vol. 21. — P. 102–105.
305. Mohmand Akbar S., Nabors Murray W. Somaclonal variant plants of wheat derived from mature embryo explants of three genotypes // *Plant Cell Rep.* — 1990. — Vol. 3, № 9. — P. 558–560.
306. Хавкин Э. Е., Забродина М. В. Наследуемые изменения в спектрах эстераз и пероксидаз у соматических кукурузы // *Молекулярно-генетические факторы и селекция растений: Материалы конференции: Аграрная наука.* — Киев, 1994. — С. 71–72.
307. Khuspe S. S., Agrawal D. C., Mascarenhas. Plant tissue culture in wheat crop improvement // *Abstr. Conf. Pap. Pl. Int. Congress Gen., New Delhi. India.* — 1983. — P. 408.
308. Ahloowalia B. S., Sherington J. Transmission of somaclonal variation in wheat // *Euphytica.* — 1985. — Vol. 34, № 2. — P. 525–537.
309. Дейнеко Е. В., Омелянчук Н. А. Соматическая изменчивость по признаку опушения листа у изогенной линии АНК-7А яровой пшеницы в культуре ткани // *Использование изогенных линий в селекционно-генетических экспериментах: I Всес. совещан. Тез. докл.* — Новосибирск, 1990. — С. 93–95.
310. Першина Л. А., Белова Л. И., Нумерова О. М., Девяткина Э. П., Зинченко Е. В. Соматическая изменчивость у регенерантов и их потомков Т. Timopheev Zhuk. и разных генотипов мягкой пшеницы // *Генет. хоз-ценных признаков высш. раст. АН СССР СО. Ин-т цитологии и генет. СО ВОГ и С.* — Новосибирск, 1990. — С. 6–20.

311. Карабаев М. К., Сидоренко О. И., Майчокина Р. М., Кошанова Л. Ш., Ушарова Г. П. Первичные процессы фотосинтеза у соматональных вариантов озимой пшеницы // Изв. АН Каз. ССР. Сер. Биол. — 1990. — № 5. — С. 27–30.
312. Hashim Z. N., Campbell W. F., Carman J. G. Morphological analysis of spring wheat (CIMMJT cv. PCYT — 10) Somaclones // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. — 1990. — Vol. 20. — P. 95–99.
313. Wang Guan lin, He Meng-yuan, Hao Shui // Acta. Bot. Sin. — 1989. — № 7. — P. 495–504. Получение и изменчивость соматоклонов добавленных линий пшенично-пырейных гибридов // Acta. Bot. Sin. — 1989. — № 7. — P. 495–504.
314. Lazar M. D., Chen T. H. H., Gusta L. V., Kartha K. K. Somaclonal variation for freezing tolerance in a population derived from norstar winter wheat // Theor. Appl. Genet. — 1988. — Vol. 75. — P. 480–484.
315. Karp A., Steele S. H., Parmar S., Jones M. G. K., Shewry P. R., Breiman A. Relative stability among barley plant regenerated from cultured immature embryos // Genome. — 1987. — Vol. 29. — P. 405–412.
316. Deambrogio E., Dale P. J. Effect of 2,4-D on the frequency of regenerated plants in barley and on genetic variability between them // Cer. Res. Commun. — 1980. — Vol. 8. — P. 417–423.
317. Orton T. J. Chromosomal variability in tissue cultures and regenerated plants of *Hordeum* // Theor. Appl. Genet. — 1980. — Vol. 56. — P. 101–112.
318. Искаков А. Р. Генотипическая изменчивость растений ячменя, полученных из культуры соматических клеток: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / Ин-т физиол. раст. и генет. — Киев, 1988. — 19 с.
319. Шевченко Д. Н. Изменчивость линий регенерантов ячменя по признакам устойчивости к болезням, морфологии и продуктивности: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 06.01.11 / Ин-т защиты растений. — Санкт-Петербург, 1994. — 18 с.
320. Henke R. R., Mansur M. A., Constantin M. J. Organogenesis and plantlet formation from organ and seedling derived calli of rice (*Oryza*) // Physiol. Plant. — 1978. — Vol. 44. — P. 11–14.
321. Oono K. In vitro methods applied to rice // Torpe T. A. Ed. Plant Tissue Culture. New York. Academic Press. — 1981. — P. 273–298.
322. Kita N., Toyoda H., Shimizu K., Ouchi S. Selection of high quality strains of tomato from callus-derived regenerants and their self pollinated progenies // Plant Tissue Culture Lett. — 1987. — Vol. 4, № 2. — P. 71–74.
323. Змеева В. Н. Тенденции изменчивости некоторых хозяйственно-полезных признаков в популяциях соматоклонов и андрогенных дигаметоидов риса *Oryza sativa* L.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.12 / Биолого-почв. ин-т. — Владивосток, 1995. — 27 с.
324. Zeng J. Z. Application of anther culture technique to crop improvement in China // Plant Cell Culture in Crop Improvement. Sen S. K., Giles K. L. Eds. New York. USA. Plenum Press. — 1983. — P. 179–210.
325. Schaeffer G. W. Recovery of heritable variability in anther-derived doubled haploid rice // Crop. Sci. — 1978. — Vol. 44. — P. 11–14.
326. Evans D. A., Sharp W. R., Medina-Filho H. P. Somaclonal and gametoclonal variation // American Journal of Botany. — 1984. — Vol. 71. — P. 759–774.
327. Valkonen J. P. T., Moritz T., Watanabe K. N., Veli-Matti Rokka. Dwarf (di) haploid potato mutants obtained from a tetraploid potato cultivar (*Solanum tuberosum* subsp. *Tuberosum*) via anther culture are defective in gibberellin biosynthesis // Plant Sci. — 1999. — Vol. 149. — P. 51–57.
328. Baenziger P. S., Wesenberg D. M., Schaffer G. W., Galun E., Feldman M. Variation among anther culture derived double haploids of «Kitt» wheat // Proc. Int. Wheat genet Symp. Kyoto Univ. Japan. — 1983. — P. 575–582.
329. Snape J. W., Sitch L. A., Simpson E., Parker B. B. Test for presence of gametoclonal variation in barley and wheat double haploids produced using the *Hordeum bulbosum* system // Theor. Appl. Genet. — 1988. — Vol. 75. — P. 509–513.
330. Павлова М. К., Пилипчук Б. З., Шведова О. Е. Соматональная изменчивость райграсо-овсяничных гибридов // Цитология и генетика. — 1994. — Т. 28, № 4. — С. 38–44.
331. Бутенко Р. Г. Клеточные технологии в селекционном процессе // Материалы Всесоюзн. конф. Москва. — 1986. — С. 29–38.
332. Сидоров В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. — Киев, 1990. — 279 с.
333. Remotti P. C. Somaclonal variation and in vitro selection for crop improvement // Somaclonal Variation and Induced Mutation in Crop Improvement. Eds. S. M. Jain, Brar D. S., Ahloowalia B. S. Kluwer Ac. Publ. Dordrecht. — 1998. — P. 169–201.

334. Goral T., Arseniuk F. Somaclonal variation in winter triticale for resistance to Fusarium Head Blight // *Cer. Res. Commun.* — 1977. — Vol. 25. — P. 741–74.
335. Jain S. M. Plant biotechnology and mutagenesis for sustainable crop improvement // *Crop improvement for stress tolerance*. R. K. Behl, D. K. Singh, G. P. Lodhi Eds. CCSHAU. Hissar, MNB New Delhi, India. — 1998. — P. 218–232.
336. Wicki W. M., Messmer M., Winzeller M., Stamp, Schmid J. E. In vitro screening for resistance against *Septoria nodorum* // *Theor Appl. Genet.* — 1999. — Vol. 99. — P. 1273–1280.
337. Ramos L., Maribona R. H., Ruiz A., Yrnera S. Somaclonal variation as a source of resistance to eyspot disease of sugarcane // *Plant. Breed.* — 1996. — Vol. 115. — P. 37–42.
338. Lorz H., Gobel E., Brown P. Advances in tissue culture and progress towards genetic transformation of cereals // *Plant Breeding.* — 1988. — Vol. 10, № 1. — P. 1–23.
339. Sotirova V. L., Shtereva N., Dimitrov B., Bogatscevska M. Resistance responses of plants regenerated from tomato anther and somatic tissue cultures to *Clavibacter michiganense* // *Israel. J. Plant Sci.* — 1999. — Vol. 47. — P. 237–243.
340. Cristinzeo G., Testa A. In vitro evolution of resistance of potato cultivar to *Phytophthora infestans* // *Potato Res.* — 1999. — Vol. 42. — P. 101–105.
341. Saunders J. W., Acquah G., Renner K. A., Doley W. P. Monogenic dominant sulfonyleurea resistance in sugar beet from somatic cell selection // *Crop Sci.* — 1992. — Vol. 32. — P. 1357–1360.
342. Bozorgipour R., Snape J. W. An assessment of somaclonal variation as a breeding tool for generating herbicide tolerant genotypes in wheat (*T. aestivum*) // *Euphytica.* — 1997. — Vol. 94. — P. 335–340.
343. Racchi M. I., Rebecchi M., Todesco G., Nielsen E., Forlani G. Glyphosate tolerance in maize (*Zea mays* L.). 2. Selection and characterization of a tolerant somaclone // *Euphytica.* — 1995. — Vol. 82. — P. 165–173.
344. Escorial M. C., Sixto H., Garcibaundin M. J., Chueca M. C. In vitro culture selection increases glyphosate tolerance in barley // *Plant Cell Tiss. Org. Culture.* — 1996. — Vol. 46. — P. 179–186.
345. Jan V. V., Demacedo C. C., Kinet J. M., Bouharmont J. Selection of Al. Resistant plant from a sensitive rice cultivar using somaclonal variation in vitro and hydroponic cultures // *Euphytica.* — 1997. — Vol. 97. — P. 303–310.
346. Sibov S. T., Gasper M., Silva M. J., Ottoboni L. M. M. Arruda P., Souza A. P. Two genes control aluminium tolerance in maize: Genetic and molecular mapping analysis // *Genome.* — 1999. — Vol. 42. — P. 475–482.
347. Winicov L. Characterization of salt tolerant alfalfa (*Medicago sativa* L.) plants regenerated from salt tolerant cell lines // *Cell Rep.* — 1991. — Vol. 10. — P. 561–564.
348. Winicov L. Characterization of rice (*Oryza sativa* L.) plants regenerated from salt tolerant lines // *Plant Sci.* — 1996. — Vol. 13. — P. 105–111.
349. Boscherini G., Muleo R., Montagni G., Cinelli F., Pellgrini M. G. Bernardini M., Buiatti. Characterization of salt tolerant plants regenerated from a *Lycopersicon esculentum* Mill. Somaclone // *J. Plant Physiol.* — 1999. — Vol. 155. — P. 613–619.
350. Adkins S. W., Kunanuvatchaidach R., Godwin L. D. Somaclonal variation in rice-drought tolerance and other agronomic characters // *Austr J. Bot.* — 1995. — Vol. 43. — P. 201–209.
351. Nelke M., Nowak J., Wright J. M., Mc Lean N. L., Laberge S., Castrouguay Y., Vezina I. P. Enhanced expression of a cold-induced gene coding for a glycine rich protein in regenerative somaclonal variants of red clover— 1999. — Vol. 105. — P. 211–217.
352. Novak F., Aiza R., Daskalov S., Lucretti T., Hermelin T. Assesment of somaclonal and radiation-induced variability in maize // *Nucl. Techn. And in vitro Cult. Plant Improve. Proc. Int. Symp., Vienna, 1985. Vienna, 1986.* — P. 29–33.
353. Kang-Le Zheng, Zong-Ming Zhou, Gou-Liang Wang, Ju-Kun Luo. Somatic cell culture of rice cultivars with different grain types: Somaclonal variation in some grain and quality characters // *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* — 1989. — Vol. 18, № 2. — P. 201–208.
354. Zhu Mu-yuan, Huang c-n, Xu A-bing, Juan Miao-bao. Отбор in vitro выносливых к алюминию вариантов каллуса ячменя и их характеристика // *Acta. Bot. Sin.* — 1990. — Vol. 32, № 10. — P. 743–748.
355. Brook H., Cook J. P., Cowley C. R., Hollingsworth M. D. Analysis of corn mutants derived from in vitro culture // *Agronomy Abstracts.* — 1984. — P. 60.

356. Eudes F., Collin J., Rioux S., Comeau A. In vitro selection for to Fusarium Head Blight in wheat anther culture // 9 Intern. Wheat Genet. Symp. Proc. Canada. — 1998. — Vol. 3. — P. 5–7.
357. Bruins B. M. Fusarium Head Blight resistance in wheat // Thesis Wageningen Agricultural Univ. Wageningen. — 1998. — 131 p.
358. Кучук Н. В. Генетическая инженерия высших растений. — Киев: Наукова думка, 1997. — 151 с.
359. Хорьков Е. И., Коваленко Е. Д., Коломиец Т. М. Вариабельность устойчивости соматоклональных форм яровой пшеницы к фитопатогенам // Мат. Межд. симп. Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология. Москва — Минск, 2001. С. 295–296.
360. Чеченева Т. М. Спонтанна мінливість in vitro у кукурудзи // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. — Київ: Логос, 2001. — Т. 1. — С. 579–585.
361. Alimgazinova B. New technologies in medicinal plants cultivation // Abstr. Inter. Symp. Biotechnology approaches for exploitation and preservation of plant resources, May 2002, Yalta. Ukraine. — 2002. — P. 25.
362. Egorova N., Bugaenko L. A., Stavtseva I. V. Methods in Breeding of Essential Oil Plants // Abstr. Inter. Symp. Biotechnology approaches for exploitation and preservation of plant resources, May 2002, Yalta. Ukraine. — 2002. — P. 79–80.
363. Катаева Н. В., Бутенко Р. Т. Клональное микроразмножение растений. — М.: Наука, 1983. — 96 с.
364. Хасси Г. Размножение растений с помощью метода культуры тканей // Биотехнология сельскохозяйственных растений / Гл. ред. S. H. Mantell. — Москва: Агропромиздат, 1987. — С. 105–134.
365. Джонс О. П. Размножение хозяйственно важных древесных растений in vitro // Биотехнология сельскохозяйственных растений / Гл. ред. S. H. Mantell. — Москва: Агропромиздат, 1987. — С. 134–152.
366. Калинин Ф. Л., Кушнир Г. П., Сарнацкая В. В. Технология микроразмножения растений. — Киев: Наукова думка, 1992. — 232 с.
367. Hu C. J., Wang P. J. Meristem, shoot tip and bud culture // D. A. Evans, W. R. Sharp., P. V. Ammirato (Eds). — New York, London: Macmillan. — 1983. — Vol. V. — P. 177–277.
368. Evans D. A., Bravo J. E. Phenotypic and genotypic stability of tissue cultured plants // Tissue Culture as a plant production system for Horticultural crops. P. H. Zimmerman, T. A. Griesbach, F. A. Hammerschlag, R. H. Lawson. — Nijhoff: Dordrecht; Netherlands. — 1986. — P. 73–94.
369. Plant Cell and Tissue Culture // I. Vasil, T. A. Thope (Eds). Kluwer Acad. Dordrecht; Netherlands. — 1994. — 550 p.
370. Митрофанова И. В. Микроразмножение субтропических и тропических плодовых культур // Биотехнологические исследования садовых и других ценных многолетних культур: Сб. науч. тр. — Ялта, 1997. — С. 63–65
371. Filipenyu J. L., Brel N. G., Popowich E. A. Adventitious Shoot regeneration of Highbush Blueberry // Intern. Symp. Biotechnology approaches for exploitation and preservation of plant resources, May 2002, Yalta. Ukraine. — 2002. — P. 21.
372. Нам И. Я., Казаков И. В., Заякин В. В. Применение биотехнологических подходов в селекции ремонтантных форм малины // Межд. симп. Молекул. мех. ген. проц. и биотехнология. Москва — Минск. — 2001. — С. 395–396.
373. Geiozeris S., Tamosiunas A., Stuopyte L. Micropropagation of Zantedeschia Hybrids // Intern. Symp. Biotechnol. approaches for exploitation and preservation of plant resources, May 2002, Yalta. Ukraine. — 2002. — P. 21.
374. Хромова Л. М. Основные результаты использования клеточно-инженерных работ для создания исходных форм и сортов картофеля // Использование клеточных технологий в селекции картофеля: Труды НИИ КХ. — Москва, 1987. — С. 21–28.
375. Митрофанова И. В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологических систем получения и сохранения декоративных и плодовых культур // Актуальні проблеми прикладної генетики, селекції та біотехнології рослин. Зб. наукових праць. — Ялта, 2009. — Т. 31. — С. 9–22.
376. Митрофанова И. В. Соматический эмбриогенез и регенерация растений Zizyphus jujube Mill. In vitro // Физиология растений. — 1997. — Т. 44, № 1. — С. 108–114.
377. Голодрыга П. Я., Зленко В. А., Бутенко Р. Г., Левенко Б. А. Ускорение размножения ценных генотипов винограда // Садоводство. — 1982. — № 3. — С. 24–27.

378. Олешко Е. В. Особенности клонального микроразмножения подвоев и сортов вишни: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.12 / Сельхоз. Академия. — Москва, 1985. — 15 с.
379. Бутенко Р. Г. Перспективы использования культивируемых клеток растений в биотехнологии. Биотехнология. — Москва: Наука, 1984. — С. 239–247.
380. Sharp W. R., Sondahl M. R., Caldas L. S., Marrafa S. B. The physiology of in vitro asexual embryogenesis // Hort Rev. — 1980. — Vol. 2. P. — 268–310.
381. Tisserat B. Clonal propagation: Palms // Cell Culture and Somatic Cell of Plants / T. K. Vasil (Eds). — Academic Press Inc. Orlando, Florida. — 1984. — P. 74–81.
382. Redenbaugh K., Viss P., Slade D., Fujii J. A. Artificial seeds // Plant Tissue and Cell Culture / C. E. Green, D. A. Somers, W. P. Hacket, D. D. Biesboer (Eds). — Alan Liss. Inc: New York. — 1987. — P. 473–493.
383. Колодяжная Я. С. Получение регенерантов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) // Межд. симп. Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология. Москва — Минск. — 2001. — С. 379–380.
384. Попович Е. А., Филипья В. Л., Решетников В. Н. Разработка эффективных методик адвентивной регенерации ряда интродуцированных культур // Межд. симп. Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология. Москва — Минск. — 2001. — С. 402.
385. Mitrofanova I. V., Jezhov V. N. In vitro propagation of *Clematis* L. through somatic embryogenesis // Intern. Symp. Biotechnol. approaches for exploitation and preservation of plant resources, May 2002, Yalta. Ukraine. — 2002. — P. 22.
386. Otmashkina N. V. Experience of introduction into in vitro cultivation of *Rhododendron legebouirii* pojark // Intern. Symp. Biotechnol. approaches for exploitation and preservation of plant resources, May 2002, Yalta. Ukraine. — 2002. — P. 23.
387. Piven M. M., Barredo-Pool F. A., Borges-Argaez L. C., Robert M. L. The key events and its regulation during somatic embryogenesis in monocots: agaves // Intern. Symp. Biotechnol. Approaches for exploitation and preservation of plant resources, May 2002, Yalta. Ukraine. — 2002. — P. 23.
388. Ignatova S. A., Zhosonar M. V. The micropropagation in anther culture of wheat — possible way multiplication of obtaining homozygous forms // Intern. Symp. Biotechnol. Approaches for exploitation and preservation of plant resources, May 2002, Yalta. Ukraine. — 2002. — P. 20.
389. Belogradova K. A., Moukhamedkhanova F. S., Matjunina, Djataev S. A. Comparative histological study of morphogenesis pathway in the callus tissues from different explants of wheat (*Triticum aestivum* L.) // Intern. Symp. Biotechnol. Approaches for exploitation and preservation of plant resources, May 2002, Yalta. Ukraine. — 2002. — P. 26–27.
390. Smolyakova O. I. Production of dihaploid lines via anther culture of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) // Intern. Symp. Biotechnol. Approaches for exploitation and preservation of plant resources, May 2002, Yalta. Ukraine. — 2002. — P. 76.
391. Boltenkov E. V. Plant regeneration from callus culture of *Iris pseudacorus* (Iridaceae) // Intern. Symp. Biotechnol. Approaches for exploitation and preservation of plant resources, May 2002, Yalta. Ukraine. — 2002. — P. 27.
392. Пирузян Э. С. Основы генетической инженерии. — М.: Наука, 1988. 303 с.
393. Скотт Р., Армитидж Ф., Уолден Р. Генная инженерия растений. — Мир, 1991. — 407 с.
394. Хиггинс И., Бест Д., Джонс Д. Биотехнология. Принципы и применения. — Мир, 1988. — 479 с.
395. Батыгина Т. Б., Васильева В. Е., Колесова Г. Е. Критические периоды в раннем онтогенезе — эмбриогенезе растений. Культура клеток растений и биотехнология. — Кишинев: Штиинца, 1983. — С. 99–100.
396. Holmberg N., Lilius G., Boiley J. E., Buelow L. Transgenic tobacco expressing *Vitreoscilla* hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolite production // Nature Biotechnol. — 1987. — Vol. 15. — P. 244–252.
397. Picton S., Barton S. L., Bouzayen M. Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene // Plant J. — 1993. — Vol. 3, № 3. — P. 469–481.
398. Thomas T. Z., Hall T. C. Gene transfer and expression in plants: implications and potential // Bio. Essay. — 1985. — Vol. 3, № 4. — P. 149–153.
399. Perlak F. G., Stone T. B., Muskopf J. M. et al. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles // Plant Mol. Biol. — 1993. — Vol. 22. — P. 313–321.

400. Рекославская Н. И., Саяев Р. К., Манелли С., Корифельд Я. В., Паковски Р. Получение высокоурожайного трансгенного томата // Междунар. симпозиум Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнологии. Минск — Москва. — 2001. — С. 410—411.
401. Powel P. A., Stark D. M., Sanders P. R., Beachy R. N. Protection against tobacco mosaic virus in transgenic plants that express tobacco mosaic virus antisense RNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1989. — Vol. 86. — P. 6949—6952.
402. Плагоцкая Т. Ц., Шульга О. А., Сидоров В. А., Захарьев В. М., Скрябин К. Г., Глеба Ю. Ю. Трансгенные растения картофеля с чужеродным геном белка оболочки X-вируса картофеля // Доклады АН СССР. — 1990. — Т. 314, № 5. — С. 1240—1242.
403. Dixon R. A., Paiva N. L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism // Plant Cell. — 1995. — Vol. 7. — P. 1085—1097.
404. Wu G., Shortt B. J., Lawrence E. B., et al. Disease resistance conferred by expression of a gene encoding  $H_2O_2$  — generating glucose oxidase in transgenic potato plants // Plant Cell. — 1995. — Vol. 7. — P. 1357—1368.
405. Mc Kersie B. D., Bowley S. R., Harjanto E., Leprince O. Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa over expressing superoxide dismutase // Plant Physiol. — 1996. — Vol. 111. — P. 1170—1181.
406. Moon B. Y., Higashi S., Gombo L., Murata N. Unsuturation of the membrane lipids of chloroplasts stabilizes the photosynthetic machinery against low temperature photoinhibition in transgenic tobacco plants // Ibid. — 1995. — Vol. 92. — P. 6219—6223.
407. Bordas M., Montesinos C., Dabausa M., et al. Transfer of the yeast salt tolerance gene HAL1 to Cucumis melo L., cultivars and in vitro evaluation of salt tolerance // Transgenic Res. — 1997. — Vol. 6. — P. 41—50.
408. Mariani C., Beuckeleer M., de Trueltuer I., et al. Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene // Nature. — 1990. — Vol. 347. — P. 737—741.
409. Khan M. R. I., Cerriotti A., Tabe L., et al. Accumulation of a sulphur-rich seed albumin from sunflower in the leaves of transgenic subterranean clover (*Tr. subterraneum*) // Ibid. — 1996. — Vol. 5. — P. 179—185.
410. Voelker T. A., Worrel A. C., Anderson L. et al. Fatty acid biosynthesis redirected to the medium chains in transgenic oilseed plants // Science. — 1992. — Vol. 257. — P. 72—74.
411. Kutchan T. Alkaloid biosynthesis — the basis for metabolic engineering of medicinal plants // Plant Cell. — 1995. — Vol. 7. — P. 1059—1070.
412. Semenyk E. G., Orlova I. V., Stremenovskii O. A., Balandin T. G., Buryanov Y. I., Nosov A. M., Deyev S. M. Antiferritin sc Fv-antibody production in transgenic tobacco plants and cell cultures // Intern. Symp. Biotechnol. Approaches for exploitation and preservation of plant resources, May 2002, Yalta. Ukraine. — 2002. — P. 75.
413. Simonenko J. V., Nifantova S. V., Komarnitski L. K., Kuchuk N. V., Yu. Yu. Gleba. Production of the transgenic pursuit-resistant plants for pea (*Pisum sativum* L.) // Intern. Symp. Biotechnol. Approaches for exploitation and preservation of plant resources, May 2002, Yalta. Ukraine. — 2002. — P. 76.
414. Ma J. K. C., Hiatt A., Hein M. Generation and assembly of secretory antibodies in plant // Science — 1995. — Vol. 6. — P. 165—174.
415. Haq T. A., Mason H. S., Clements J. D., Artzen C. J. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants // Science. — 1995. — Vol. 228. — P. 714—716.
416. Tissue culture catalogue 98—99 Duchefa. Biochemie B. V. Biochemicals, The Netherlands.
417. Gouli V. V., Gouli S. V. Transgenic plants as an object of scientific and public discussion in the USA. // Intern. Symp. Biotechnol. Approaches for exploitation and preservation of plant resources, May 2002, Yalta. Ukraine. — 2002. — P. 67.
418. Power J. B., Davey M. R. Laboratory Manual: Plant protoplasts (Isolation, Fusion, Culture, Genetic Transformation). Nottingham, Univ. Nottingham/ — 1979.
419. Carlson P. S., Smith H. H., Dearing R. D. Parasexual interspecific plant hybridization // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1972. — Vol. 69. — P. 2292—2294.
420. Melhers G., Mohri J., Watanabe K., et al. One-step generation of cytoplasmic male sterility by fusion of mitochondrial-inactivated tomato protoplasts with nuclear inactivated *Solanum* protoplasts // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1992. — Vol. 89. — P. 6832—6836.
421. Melhers G., Labib G. Somatic hybridization of plants by fusion of protoplasts selection of light resistant hybrids of haploid «sensitive varieties» of tobacco // Molec. Genet. — 1974. — Vol. 135. — P. 277—294.
422. Глеба Ю. Ю., Бутенко Р. Г., Сытник К. М. Слияние протопластов и парасексуальная гибридизация *Nicotiana tabacum* L. // Докл. АН СССР. — 1975. — Т. 221. — С. 1196—1198.

423. Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Клеточная инженерия растений. — К.: Наукова думка, 1984. — 160 с.
424. Сидоров В. А., Пивень Н. М., Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Соматическая гибридизация пасленовых. — К.: Наукова думка, 1985. — 132 с.
425. Akagi H., Taguchi T., Fujimura T. Stable inheritance and expression of the CMS trains introduced by asymmetric protoplasts fusion // *Theor. Appl. Genet.* — 1995. — Vol. 91. — P. 563–567.
426. Liu B., Liu Z. Z., Li X. W. Production of a highly asymmetric somatic hybrid between rice and *Zizania latifolia* evidence for inter-genomic exchange // *Theor. Appl. Genet.* — 1999. — Vol. 98. — P. 1099–1103.
427. Park S. J., Walsh E., Reinbergs E., Song S. P., Kasha K. J. Field performance of double — haploid barley lines in comparison with lines developed by pedigree and SSD methods // *Can. J. Plant Sci.* — 1976. — Vol. 56. — P. 467–474.
428. Wenzeler H., Schmid J., Fried P. M. Field performance of androgenetic doubled haploid spring wheat lines in comparison with lines selected by the pedigree system // *Plant Breed.* — 1987. — Vol. 99. № 1. — P. 41–48.
429. Picard E., Dusautoir J. C., Gregoire S., Meunier Y. P., Verly E. Comparison of method of producing homozygous lines in wheat: preliminary data // *Bot. De France. — Actualites. Botom.* — 1986. — Vol. 133. — P. 73.
430. Courtois B. Comparison single seed descent and anther culture-derived lines of three single cross of rice // *Theor. Appl. Genet.* — 1993. — Vol. 85, № 5. — P. 625–631.
431. Charmet G., Branlard G. A comparison of androgenetic doubled — haploid and single seed descent lines of Triticale // *Theor. Appl. Genet.* — 1985. — Vol. 71, № 2. — P. 193–200.
432. Mitchell M. J., Busch R. H., Rines H. W. Comparison of lines derived by anther culture and single seed descent in a spring wheat cross // *Strop. Sci.* — 1992. — Vol. 32, № 6. — P. 1446–1451.
433. Поддубная-Арнольди В. А. Цитоэмбриология покрытосеменных растений. Основы и перспективы. — М.: Наука, 1976. — 508 с.
434. Ходорцова Л. Ф. Использование культуры зародышей и пыльников *in vitro* в создании селекционного материала у тритикале: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / Ин-т генет. и цитологии Бел. ССР. — Минск, 1987. — 17 с.

435. Бутенко Р. Г. Дифференцировка и морфогенез в культуре тканей, клеток и протопластов // *Биология развития растений.* — М.: Наука, 1975. — С. 48–66.
436. Сулима Ю. Г., Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А. Получение гаплоидов тритикале методом культуры пыльников *in vitro* // Апомиксис у растений и животных. Тр. Биолог. ин-т. Акад. наук СССР. Сиб. отд. — Новосибирск: Наука, 1978. — С. 206–210.
437. Лукьянюк С. Ф., Сулима Ю. Г., Игнатова С. А. Получение гаплоидных растений тритикале при культивировании пыльников // Доклады ВАСХНИЛ. — 1979. — № 1. — С. 7–10.
438. Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А., Созинов А. А. Использование приемов *in vitro* для создания гаплоидов у ячменя и тритикале // *Tag. — Ber., Akad. Landwirtsch. — Wiss. DDR, Berlin.* — 1983. — Bd 207. — S. 41–48.
439. Батыгина Т. Б., Круглова Н. Н., Горбунова В. Ю. Андрогенез *in vitro* у злаков: анализ с эмбриологических позиций // *Цитология.* — 1994. — Т. 36, № 9–10. — С. 993–1005.
440. Tsou J. H., Liang C. C., Chen W. W. Effect of some active substances on differentiation of green pollen plants // *Proc. Symp. Anther Cult. Sci. Press. Peking.* — 1978. — P. 269–270.
441. Weatherhead M. A., Henshaw G. G. The induction of embryoids in free pollen culture of potatoes // *Z. Pflanzphys.* — 1979. — Vol. 94. — P. 441–447.
442. Игнатова С. А., Лукьянюк С. Ф. Аминокислоты пыльников тритикале при культивировании *in vitro* // Научно-технич. бюлл. ВСГИ. — 1992. — Вып. 3, № 45. — С. 26–31.
443. Sangwan-Norrel B. S. Androgenic stimulating factors in the anther and isolated pollen grain culture of *Datura innoxia* // *J. Exp. Bot.* — 1977. — Vol. 28. — P. 39–44.
444. Максимова В. И., Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А. Влияние аминокислот на морфологические изменения микроспор тритикале в культуре *in vitro* // Тезисы 3 республ. Конф. физиологов и биохимиков Молдавии. — Кишинев: Штиинца, 1981. — 58 с.
445. Staba E. J. Production of cardiac glycosides by plant tissue cultures // *J. Pharm. Sci.* — 1962. — Vol. 51, № 3. — P. 249–259.
446. Sozinov A., Lukjanjuk S., Ignatova S. Anther cultivation and induction of haploid plants in Triticale // *Z. Pflanzenzuchtg.* — 1981. — Vol. 86. — P. 272–285.

447. Способ получения гаплоидов из микроспор злаков: А. с. 4273872/30–13 СССР, МКИ А 01 Н 1/04/ Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А., Махновская М. Л. (СССР). — № 1495373, Заявлено 13. 05 87; Оpubл. 23. 07. 89, Бюл № 27. — 8 с.
448. Лукьянюк С. Ф., Махновская М. Л., Игнатова С. А., Шерер Н. В. Значение условий выращивания в получении гаплоидов пшеницы и тритикале // Сб. научных трудов ВСГИ. Использование искусственного климата в селекционно-генетических исследованиях. — Одесса, 1988. — С. 82–92.
449. Махновская М. Л., Лукьянюк С. Ф., Шерер Н. В., Игнатова С. А., Литвиненко Н. А. Изучение условий культивирования пыльников пшеницы и тритикале с целью повышения эффективности и гаплопродукции // Сб. Вопросы селекции и генетики зерновых культур. КОУ стран — членов СЭВ. Одесса/ СССР/ ИИЗК Бернбург /ГДР/. — 1990. — Вып. 4. — С. 37–76.
450. Батыгина Т. Б. Хлебное зерно. Атлас. — Ленинград: Наука, 1987. — 102 с.
451. Reinert J., Bajaj Y. P. S. Anther Culture: Haploid production and its significance // Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer-Verlag, Berlin. — 1977. — P. 251–267.
452. Lukjanjuk S. F., Ignatova S. A. III 2 Triticale: Production of Haploid and Homozygous Plants // Biotechnology in Agricultural and Forestry Crop I (Ed Y. P. S. Bajaj) Springer-Verlag, Berlin. — 1986. — Vol. 2. — P. 530–543.
453. Лукьянюк С. Ф., Шерер Н. В., Махновская М. Л., Игнатова С. А. Разработка технологии получения гаплоидов пшеницы посредством культуры пыльников // Тез. докл. Межд. конференции Биология культивируемых клеток и биотехнология. — Новосибирск, 1988. — Т. 2. — С. 209–210.
454. Chawla H. S. Isozyme modifications during morphogenesis of callus from barley and wheat // Plant, Cell and Tissue Organ Culture. — 1988. — Vol. 12, № 3. — P. 299–304.
455. Kavi Kishor P. B. Aromatic amino acid metabolism during organogenesis in rice callus cultures // Physiol. Plant. — 1989. — Vol. 75, № 3. — P. 395–398.
456. Круглова Н. Н., Горбунова В. Ю., Батыгина Т. Б. Эмбриогенез как путь морфогенеза в культуре изолированных пыльников злаков // Успехи современной биологии. — 1995. — Т. 115, № 6. — С. 692–705.
457. Махновская М. Л., Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А. Способ регенерации растений в культуре ткани: А. с. 3986060 СССР, МКИ А 01 Р 3/00/ Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А., Махновская М. Л. (СССР). — № 1380689; Заявлено 5. 12 85; Оpubл. 15. 11. 87, Бюл. № 10. — 6 с.
458. Ronchi V. N., Caligo M. A., Nozzolini M., Luccarini G. Stimulation of carrot somatic embryogenesis by proline and serine // Plant Cell Repts. — 1984. — Vol. 3, № 5. — P. 210–214.
459. Charmet G., Bernard G. Diallel analysis of androgenetic plant production in hexaploid Triticale (X. triticosecale, Wittmack) // Theor. Appl. Genet. — 1984. — Vol. 69. — P. 55–61.
460. Chen C C, Lin C M. Genotypic differences in plant production in anther culture of rice // Plant, Cell, Tissue Cult. Acad. Sinica. Taipei. — 1981. — P. 199–203.
461. Внучкова В. А. Получение фертильного потомства от гаплоидных растений тритикале, выращенных из пыльников in vitro // Доклады ВАСХНИЛ. — 1980. — № 8. — С. 15–17.
462. Махновская М. Л., Игнатова С. А., Максимов Н. Г. Проявление способности к гаплопродукции в гибридных популяциях тритикале // Наук. тех. бюл. СГІ. — Одесса, 1993. — В. 84, № 2. — С. 51–55.
463. Machnovskaya M., Ignatova S., Litvinenko N., Babayants L. Anther culture in breeding of common wheat for stress resistance // 9 Intern. Wheat Genet. Symp. Proc. Canada. Saskaton. — 1998. — Vol. 3. — P. 198–199.
464. Махновська М. Л., Литвиненко М. А., Ігнатова С. О. Удосконалення технології одержання подвоєних гаплоїдів озимої м'якої пшениці // Науково-технічний бюлетень СГІ. — 1997. — В. 87, № 1. — С. 32–36.
465. Махновская М. Л., Литвиненко Н. А., Игнатова С. А. Технология получения удвоенных гаплоидов и источников высокой андрогенетической способности у пшеницы // Цитология и генетика. — 1999. — Т. 33, № 2. — С. 45–49.
466. Reddy N. Transfer of drought tolerance from Triticum tauschii to bread wheat (Triticum aestivum) // Proc. 9 Intern. Wheat Genet. Symp. Canada Saskaton. — 1998. — Vol. 4. Sec 7. — P. 72–73.
467. Foroughi-Wehr B., Freidt W. Rapid production of recombinant barley yellow mosaic virus resistant Hordeum vulgare lines by anther culture // Theor. Appl. Genet. — 1984. — Vol. 67. — P. 377–382.

468. Столярова С. В., Дьячук Т. И. Метод культуры пыльников в межвидовой гибридизации пшеницы // Материалы науч. конф. по сельскохозяйственной биотехнологии. — Целиноград, 1991. — С. 54–55.
469. Зибарова И. В., Рыбалка А. И., Шестопал О. Л., Игнатова С. А. Андрогенетическая способность удвоенных гаплоидов отдаленных гибридов пшеницы в культуре *in vitro* // Тез. докл. междунар. конф. Агробиотехнологии растений и животных. — Киев, 1997. — С. 95.
470. Зибарова И. В., Рыбалка А. И., Махновская М. Л., Игнатова С. А. Индукция удвоенных гаплоидов в культуре пыльников отдаленных гибридов пшеницы // Тез. докл. междунар. конф. Агробиотехнологии растений и животных. — Киев, 1997. — С. 95–96.
471. Зибарова И. В., Рыбалка А. И., Игнатова С. А. Анализ выхода регенерантов при культивировании пыльников интрогрессивных форм пшеницы // Цитология и генетика. — 1998. — Т. 32, № 6. — С. 73–77.
472. Созинов А. А., Лукьянюк С. Ф., Максимова В. И., Игнатова С. А. Морфогенез в культуре пыльников тритикале // Научно-технический бюллетень ВСГИ. — 1981. — В. 40, № 2. — С. 56–62.
473. Созинов А. А., Лукьянюк С. Ф., Максимова В. И., Игнатова С. А. Изучение морфогенеза в культуре пыльников тритикале // Ser. Res. Commun. — 1981. — Vol. 9, № 2. — P. 103–113.
474. Sunderland N., Roberts M., Evans L. I., Wildon D. C. Multicellular pollen formation in cultured barley anthers. I independent division of the generative and vegetative cells // I. Exp. Bot. — 1979. — Vol. 30. — P. 119–123.
475. Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А. Изучение влияния различных факторов на гаплопродукцию при культивировании пыльников тритикале // Всесоюзная IV конф. Культура клеток растений и биотехнология. — Кишинев: Штиинца, 1983. — С. 160.
476. Mix G., Wilson H. M., Foroughi-Wehr B. The cytological status of plant of *Hordeum vulgare* L. regenerated from microspore callus // Z. Pflanzensucht. — 1978. — Vol. 80, № 2. — P. 89–99.
477. Vaughn K. C., Bonte De L. R., Wilson K. G., Schaeffer G. W. Organellar alteration as a mechanism for maternal inheritance // Science. — 1980. — Vol. 208. — P. 196–198.

478. Clapham D. Haploid induction in cereals // J. Reinert, Y. Bajaj (Eds). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. Springer. Berlin, New York. — 1977. — P. 279–298.
479. Sun C S, Wu S C, Wang C. C., Chu C C. The deficiency of soluble proteins and plastid ribosomal RNA in the albino pollen plantlets of rice // Theor. Appl. Genet. — 1979. — Vol. 55. — P. 193–197.
480. Chu C C. Haploids in plant improvement // I. K. Vasil, W. R. Scowcroft, K. J. Frey (Eds). Plant improvement and somatic cell genetics. London. Acad. Press. — 1982. — P. 129–158.
481. Wang C C, Sun C S, Chu Z. On the conditions for the induction of rice pollen plantlets and certain factors affecting the frequency of induction // Acta Bot. Sinica. — 1974. — Vol. 16. — P. 43–53.
482. Bernard S. In vitro androgenesis in hexaploid triticale: Determination of physical conditions increasing embryoid and green plant production // Z. Pflanzenzuecht. — 1980. — Vol. 85. — P. 308–321.
483. Lee J., Chen C C. Genetic and histological evidence for microspore origin of anther-derived plants of rice // Taiwan. — 1982. — Vol. 27. — P. 86–92.
484. He Din-gang, Ouyan Tsun-wen. On pollen albino plants 1. // Ann. Rep. 1982. Inst. Genet. Acad. Sinica, Science Press. Beijing. — 1983. — P. 29–30.
485. Sunderland N., Huang B. Barley anther culture — The switch of programme and albinism // Hereditas Suppl. — 1985. — Vol. 3. — P. 27–40.
486. Huang B., Sunderland N. Temperature stress pretreatment in barley anther culture // Ann. Bot. — 1982. — Vol. 49. — P. 77–88.
487. Tsukahara M., Hirotsawa T., Murayama H. Effect of culture methods on the regeneration of albino rice (*Oryza sativa* L.) plantlets // Plant Cell Reports. — 1996. — Vol. 8. — P. 597–600.
488. Sun C S, Wang C C. The ultrastructure of plastids in the albino pollen plants of rice // Sci. Sinica. — 1974. — Vol. 17. — P. 793–802.
489. Dunford R., Walden R. M. Plastid genome structure and plastid-related transcript levels in albino barley plants derived from anther culture // Current genetics. Berlin. Springer Intern. — 1991. — Vol. 20, № 4. — P. 339–347.
490. Liang C C, Chou J. H., Chen W. M. A study of submicroscopic structure and metabolic blocs in the albino anther plants of rice // Proc. Symp. Plant Tissue Culture. Science Press. Peking. — 1978. — P. 161–166.

491. Игнатова С. А. Аминокислоты пыльников и завязей тритикале в период развития микроспор // Тезисы докладов Всесоюзного симпозиума. Развитие мужской гаметофитной сферы растений (морфофизиологические особенности). — 1983. — С. 33.
492. Day A., Ellis T. H. Chloroplast DNA deletions associated with wheat plants regenerated from pollen: possible basis for maternal inheritance of chloroplasts // *Cell*. — 1984. — Vol. 39, 2pt. 1. — P. 359–368.
493. Day A., Ellis T. H., Noel H. Deleted forms of plastid DNA in albino plants from cereal anther culture // *Curr. Genetic*. — 1985. — Vol. 9, № 8. — P. 671–678.
494. Ананьев Е. В., Бочканов С. С., Сониная Н. В., Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А., Сечняк Л. К. Изменение структуры хлоропластного генома у регенерантов тритикале, полученных из микроспор при культивировании пыльников // Доклады ВАСХНИИЛ. — 1986. — № 6. — С. 2–3.
495. Созинов А. А., Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А. Использование метода культуры изолированных органов и тканей в создании исходного материала для селекции // Селекция и семеноводство. — Киев, 1981. — Вып. 6. — С. 3–8.
496. Лукьянюк С. Ф., Махновская М. Л., Максимов Н. Г., Игнатова С. А. Роль донорного материала в гаплопродукции тритикале // Экологическая генетика растений и животных: Тез. III Всесоюз. конф. — Кишинев: Штиинца, 1987. — С. 208–209.
497. Лукьянюк С. Ф., Махновская М. Л., Игнатова С. А., Максимов Н. Г. Роль генотипа в гаплопродукции тритикале // Научно-технический бюллетень ВСГИ. — Одесса, 1988. — Вып. 68, № 2. — С. 43–47.
498. Дэвис Д., Джованелли Д., Рис Т. Биохимия растений. — М.: Мир, 1966. — 512 с.
499. Ignatova S. A., Simonenko L. K., Zaderej N. S. Cytogenetic study of green plants development from anther culture in hybrids *T. aestivum* with *Agrotriticum* // *European Wheat Aneuploid Co-operative*. Novosibirsk: Russia. — 2000. — P. 125.
500. Анапияев Б. Б. Экспериментальный морфогенез и биотехнология получения гаплоидов в культуре микроспор пшеницы: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 06.01.05 / С-х акад. — М., 2001. — 50 с.
501. Anapiyayev B. B., Iskakova K., Yevdakova N., Kazkeev D., Rahimbaev I. R. Haploid biotechnology in rapid selection of *Triticum aestivum* L. for resistance // *Adstr. Intern. Symp. «Biotechnology approaches for exploitation and preservation of plant resources» Yalta, Ukraine*. — 2002. — P. 79.
502. Данилова Т. В. Оптимизация методики получения гаплоидов мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в культуре пыльников *in vitro* и возможности использования их в селекции: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 06.01.05 / Моск. С-х акад. — М., 2000. — 16 с.
503. Kartha K., Graf R. Mc Kenzie wheat // *Bull. Plant Biotechnol. Inst. (Canada)*. — 1999. — № 1. — P. 9–12.
504. Ткаченко О. В. Культура тканей *in vitro* короткостебельной мягкой и твердой пшеницы: Автореф. дис. ... канд. сельхоз. наук: 06.01.05/ Саратовск. гос. унив. — Саратов, 2001. — 24 с.
505. Ghaemi M., Sarrafi A., Alibert G. Influence of Genotype, Media composition, Cold Pretreatment and their interactions on Androgenesis in Durum Wheat (*Triticum turgidum*) // *Cer. Res. Commun.* — 1995. — Vol. 23, № 3. — P. 215–222.
506. Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А. Факторы, определяющие морфогенез и выход гаплоидов в культуре пыльников тритикале // Тезисы докладов Межд. научной конф. ученых стран — членов СЭВ «Теоретические и прикладные аспекты селекции и семеноводства пшеницы, ржи, ячменя и тритикале». — Одесса, 1981. — С. 34–35.
507. Kasha K. J., Hu T. C., Simion E., Oro R. Cytological development of wheat microspores in culture // *Proc. 9 Intern. Symp. Canada. Saskatoon*. — 1988. — Vol. 1. — Sec. 5. — P. 152–155.
508. Caredda S., Doncoeur C., Devaux P., Sangwan R. S. Plastid differentiation during androgenesis in albino and non-albino producing cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Sex. Plant Reprod.* — 2000. — Vol. 13. — P. 95–104.
509. Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А. Выявление генетического разнообразия у тритикале при получении гаплоидов // Всесоюз. конф. «Адаптация и рекомбиногенез у культурных растений». — Кишинев, 1979. — С. 61–62.
510. Kuchuk N. V. Plastoma transformation — clipboard approach // *Intern. Symp. Biotechnol. Approaches for exploitation and preservation of plant resources, May 2002, Yalta, Ukraine*. — 2002. — P. 67.
511. Brink R. A., Cooper D. C., Ausherman L. E. A hybrid between *Hordeum jubatum* and *Secale cereale* // *J. Heredity*. — 1944. — Vol. 35. — P. 67–75.

512. Ивановская Е. В. Культура гибридных зародышей злаков на искусственной среде // Докл. АН СССР. — 1946. — Т. 54, № 5. — С. 470–472.
513. Raghavan V. Applied aspects of embryo culture // Applied and Fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. J. Reichert, Y. P. S. Bajaj (Eds). Springer, Berlin. — 1977. — P. 375–397.
514. Raghavan V., Srivastava P. S. Embryo culture // Exp. Embryolog. Vascular Plants. — 1982. — P. 195–230.
515. Walsh E. J. Efficiency of the Haploid Method of Breeding Autogamous Diploid Species: Computer Stimulation Study // Haploids in Higher Plant. K. J. Kasha (Ed.) Guelph. — 1974. — P. 195–209.
516. Griffing B. Efficiency changes due to use of doubled-haploids in recurrent selection methods // Theor. Appl. Genet. — 1975. — Vol. 455. — P. 367–386.
517. Jensen C. J. Producing haploid plants by chromosome elimination // Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvements. Proc. Int. Work Shop. Peking, China. — 1981. — P. 55–157.
518. Symko S. Haploid barley from crosses of *Hordeum bulbosum* (2x) x *H. vulgare* (2x) // Can. J. Genet. Cytol. — 1969. — Vol. 11. — P. 602–608.
519. Subrahmanyam N. C., Kasha J. K. Selective chromosome elimination during haploid formation in barley following interspecific hybridization // Chromosoma. — 1973. — Vol. 42. — P. 111–125.
520. Idzikowska k., Młodzianowski F. Ultrastructural aspects of chromatin elimination in embryos of *Hordeum* // Acta Societatis Botanicorum Poloniae. — 1983. — Vol. 52, № 3–4. — P. 197–200.
521. Bennet M. D., Finch R. A., Barclay. The time, rate and mechanism of chromosome elimination in *Hordeum* hybrids // Chromosoma. — 1976. — Vol. 54. — P. 175–200.
522. Simpson E., Snape J., Finch R. A. Variation between *Hordeum bulbosum* genotypes in their ability to produce haploids of barley, *Hordeum vulgare* // Z. Pflanzenzuchtg. — 1980. — Vol. 85. — P. 205–211.
523. Novak F. J. Haploidie u vyssich roslin a jeji vyuziti ve slechteni // Priloha casopisu Sbornik Uvtiz — Genetica a slechteni. — 1983. — Vol. 19, № 2. — P. 1–XIX.
524. Pickering R. A. The influence of genotype on doubled haploid barley production // Euphytica. — 1983. — Vol. 32. — P. 863–876.
525. Махновська М. Л., Шепель Л. С., Ігнатова С. О. Удосконалення технології одержання гібридних рослин від схрещувань *Hordeum vulgare* (2n=14) x *Hordeum bulbosum* (2n=28) з використанням культури *in vitro*. Фактори експериментальної еволюції організмів. — Київ: Логос, 2006. — Т. 3. — С. 494–499.
526. Шестопал О. Л., Махновська М. Л., Ігнатова С. О. Особливості успадкування ознак дикого ячменю у гібридів *Hordeum vulgare* x *Hordeum spontaneum* — Фактори експериментальної еволюції організмів, т. 5, Київ- Логос — 2008 — P. 216–221.
527. Kasha K. J., Kao K. N. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.) // Nature. — 1970. — Vol. 225. — P. 874–876.
528. Fukuyama T. Genetic control of chromosome elimination in the interspecific hybrids between *Hordeum bulbosum* and *Hordeum vulgare* // Abstr. 5 Intern. Barley Genetics Symp. Okayama Japan. — 1986. — 4-M-2. — P. 82.
529. Jensen C. J. Barley monploids and doubled monploids: Techniques and experiences // Barley Genetics III (H. Gaul Ed.) Verlag. Munchen. — 1975. — P. 316–345.
530. Jensen C. J. Barley monploids and doubled monploids: Techniques and experiences // Barley Genetics III Proc. 3 Int. Barley Genet. Symp. Garching. 1975. H. Gaul (Ed.). — 1976. — P. 849.
531. Jensen C. J. Producing haploid plants by chromosome elimination // Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crops Improvement. Science Press. Beijing, China. — 1983. — P. 55–79.
532. Голубинский И. Н. Биология прорастания пыльцы. — Киев: Наукова думка, 1974. — 367 с.
533. Батыгина Т. Б., Васильева В. Е. Поведение зародышей некоторых покрытосеменных в культуре *in vitro* // 3 Всесоюзн. конф. по культуре клеток растений. — Абовян, 1979. — С. 129.
534. Лукьянюк С. Ф., Ігнатова С. А., Паянова О. А. Сравнительное изучение роста и развития гаплоидных и диплоидных зародышей ячменя *in vitro* // IV Всесозн. конф. «Культура клеток растений и биотехнология». — Кишинев: Штиинца. — 1983. — С. 185.
535. Банникова В. П., Хведынич О. А., Кравец Е. А. Основы эмбриогенеза злаков. — Киев: Наукова думка, 1991. — 175 с.
536. Вовчук С. В., Лукьянюк С. Ф., Ігнатова С. А. Динамика изменения активности протеиназ и ингибитора трипсина в зерне ячменя при созревании // Физиология и биохимия культурных растений. — 1983. — Т. 15, № 3. — С. 262–266.
537. Lukjanuk S. P., Ignatova S. A., Navolotsky V. D. The investigation of the process of haploid development in *Hordeum vulgare* with the

- help of haploproducers // Abstr. Intern. Symp. Plant Tissue and Cell Culture Application to Crop Improvement. Olomouc. Czechosl. — 1984. — P. 111.
538. Lukjanuk S. P., Ignatova S. A., Navolotsky V. D. The investigation of the process of haploid development in *Hordeum vulgare* with the help of haploproducers // Proceed. Intern. Symp. Plant Tissue and Cell Culture Application to Crop Improvement cd. Novak. Olomouc. Czechosl. — 1984. — P. 251–252.
539. King R. W. Absciscic acid in developing wheat grains and its relationship to grain growth and maturation // *Planta*. — 1976. — Vol. 132. — P. 43–51.
540. Norstog K. Embryo culture as a Tool in the Study of Comparative and Developmental Morphology (13) // *Plant Cell and Tissue Culture Principles and Application*. Ed. W. R. Sharp et al. — 1977. — P. 179–202.
541. Батыгина Т. Б., Бутенко Р. Г. Морфогенетические потенции зародыша покрытосеменных растений (на примере представителей рода *Raemonia* сем. *Raemoniaceae*) // *Ботанический журнал*. — 1981. — Т. 66, № 11. — С. 1531–1548.
542. Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А., Наволоцкий В. Д., Шеремет А. М. Использование гаплоидов для интенсификации процесса получения исходного материала в селекции ячменя // Доклады ВАСХНИЛ. — 1983. — № 7. — С. 9–11.
543. Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А. Метод гаплоидии в селекции зерновых культур // *Сельскохозяйственная биология*. — 1983. — № 5. — С. 8–15.
544. Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А., Максимова В. И., Наволоцкий В. Д., Шеремет А. М. Получение гаплоидов при скрещивании *Hordeum vulgare* с *Hordeum bulbosum* // Доклады ВАСХНИЛ. — 1980. — № 2. — С. 7–10.
545. Pickering R. A., Morgan P. W. Plant regeneration from cultured embryos derived from *Hordeum vulgare* L. pollinated with *Hordeum bulbosum* // *Euphytica*. — 1983. — Vol. 32. — P. 585–591.
546. Внучкова В. А., Чеботарева Т. М., Молчанова Л. М. Получение гаплоидов ячменя в культуре ткани при использовании гаплопродюсера // *Сельскохозяйственная биология*. — 1985. — № 10. — С. 46–48.
547. Мостипан Н. И. Получение гаплоидов и дигаплоидов культурного ячменя путем скрещивания его с *Hordeum bulbosum*: Авто- реф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / Укр. НИИ Растениеводства, селекции и генетики. — Харьков, 1989. — 16 с.
548. Чистякова В. Н. Генотип как фактор эффективной экспериментальной гаплоидии у ячменя // Принципы и методы селекции и семеноводства зерновых и зернобобовых культур в Нечерноземье. НИИ с/х центр. районов Нечерноз. зоны. — Москва. — С. 215–231.
549. Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А., Шеремет А. М. Скрещивания *Hordeum vulgare* x *Secale cereale* как возможный путь получения гаплоидов // Научно-технический бюллетень ВСГИ. — Одесса, 1981. — В. 3, № 41. — С. 19–22.
550. Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А., Шеремет А. М. Скрещивания *Hordeum vulgare* x *Secale cereale* как возможный путь получения гаплоидов // Всесоюзн. совещ. «Отдаленная гибридизация растений и животных». — Москва, 1981. — С. 112–113.
551. Наволоцкий В. Д., Шеремет А. М., Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А. Гаплоидия и селекция ячменя // Междунар. конфер. ученых стран — членов СЭВ «Теоретические и прикладные аспекты селекции и семеноводства пшеницы, ржи, ячменя и тритикале». — Одесса: ВСГИ. — 1981. — С. 41–42.
552. Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А. Использование эмбриокультуры для создания исходного материала в селекции ячменя // Научно-технический бюллетень ВСГИ. — Одесса, 1984. — Вып. 54, № 4. — С. 8–12.
553. Fedak G. Barley monoploids and hybrids from barley x rye crosses // Interspecific hybridization in plant breeding. Proc. 8 Congr. Eucarpia. Madrid. — 1977. — P. 269–273.
554. Тарасенко Н. Д. Генетические методы в селекции растений. — М.: Колос, 1974. — 208 с.
555. Kaltskikes P. J. Methods for Triticale production // *Pflanzenzüchtg.* — 1974. Vol. 3. — P. 264–266.
556. Suddiqui K. A. A induction of polyploidy in multigeneric hybrids in the group *Triticeae* // *Hereditas*. — 1971. — Vol. 67, № 3. — P. 191–203.
557. Thiebaut J., Kasha K. J. Modification of the colchicinae technique for chromosome doubling of barley haploids // *Can. J. Genetics Cytol.* — 1978. — Vol. 4. — P. 513–521.
558. Савельева Т. И. Действие колхицина совместно с диметилсульфоксидом на полиплоидизацию проростков кукурузы // Вопросы ботаники и генетики. — 1975. — С. 38–39.

559. Bell D. H. Investigation in the Triticinae. 1. Colchicine techniques for chromosome doubling in interspecific and intergeneric hybridization // *J. Agr. Sci.* — 1950. — Vol. 40, № 1. — P. 9–18.
560. Игнатова С. А., Лукьянюк С. Ф. Исследование диплоидизации гаплоидов ячменя и тритикале // *Цитология и генетика.* — 1980. — Т. 14. — № 5. — С. 60–63.
561. Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А. Получение гаплоидов ячменя с помощью гаплопродюсеров: Методические рекомендации. Одесса, 1983. — 21 с.
562. Наволоцкий В. Д. Селекция ярового ячменя для условий недостаточного увлажнения: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 06.01.05/ Всесоюзный ин-т растениеводства. — Ленинград, 1989. — 47 с.
563. Choo T. Doubled haploids for studying the inheritance of quantitative characters // *Genetics.* — 1981. — Vol. 99. — P. 525–540.
564. Choo T., Reinbergs E., Park S. J. Comparison of frequency distributions of doubled haploid and single seed descent lines in barley // *Theor. Appl. Genet.* — 1982. — Vol. 61. — P. 215–218.
565. Наволоцкий В. Д., Сечняк Л. К., Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А. Новая технология селекции ячменя с использованием гаплоидии // *Вестник сельхоз. науки.* — 1985. — Т. 344, № 5. — С. 34–45.
566. Blakslee A., Belling J., Farnham M. E., Berger A. D. A haploid mutant in *Datura stramonium* // *Science.* — 1922. — Vol. 55. — P. 646–647.
567. Хохлов С. С., Тырнов В. С., Гришина Е. В. Гаплоидия и селекция. — М.: Наука, 1976. — 221 с.
568. Кириллова Г. А. Явление гаплоидии у покрытосеменных растений // *Генетика.* — 1966. — № 2. — С. 136–147.
569. Snape I. W. A theoretical comparison of diploidised haploid and single seed descent populations // *Heredity.* — 1976. — Vol. 36, № 2. — P. 275–277.
570. Choo T. Doubled haploids for locating polygenes // *can. J. Genet. Cytol.* — 1983. — Vol. 25, № 5. — P. 425–429.
571. Kasha K. J., Reinbergs E. Recent developments in the production and utilization of haploid in barley // *Proc. 4 Intern. Barley Genetics Symp. Edinburgh.* — 1981. — P. 655–663.
572. Reinbergs E., Park S. J., Song L. S. P. Early identification of superior barley crosses by doubled haploid technique // *Z. Pflanzenzuchtg.* — 1976. — Vol. 76. — P. 215–225.

573. Turcotte P., St-Pierre C. A., Kah Ming Ho. Comparison entrades liguese pedigree et des lignes haploides doubles chez l'orge (*H. vulgare L.*) // *Gen. J. plant Sci.* — 1980. — Vol. 60. — P. 79–85.
574. Song L. S. P., Park S. J., Reinbergs E., Choo T. M., Kasha K. J. Doubled haploid VS the black plot method for production homozygous lines in barley // *Z. Pflanzenzuchtg.* — 1978. — Vol. 81. — P. 271–290.
575. Ho K. M., Jones G. E. Mingo barley // *Can. J. Plant Sci.* — 1980. — Vol. 60. — P. 279–280.
576. Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А., Наволоцкий В. Д. Получение гаплоидов ячменя с помощью гаплопродюсера и использование гомозиготных линий в селекции // *Геном ячменя и проблемы его улучшения: Сб. науч. тр. ВСГИ.* — Одесса, 1989. — С. 76–83.
577. Наволоцкий В. Д., Прокопенко С. Е. Яровой ячмень Прерия // *Селекция и семеноводство.* — 1992. — № 1. — С. 54–55.
578. Дорофеев В. Ф. Отдаленная гибридизация в эволюции и селекции пшеницы // *Всесоюз. совещание «Роль отдаленной гибридизации в эволюции и селекции пшеницы».* — Тбилиси, 1985. — С. 7–8.
579. Вавилов Н. И. Избранные сочинения. — М.: Колос, 1966. — С. 32–56.
580. Мустафаев И. Д. Межвидовая и межродовая гибридизация — мощный фактор формообразования пшениц // *Всесоюз. совещание «Роль отдаленной гибридизации в эволюции и селекции пшеницы».* — Тбилиси, 1985. — С. 8–13.
581. Litvipenko M., Rybalka A., Lyfenko S., Poperelya F., Babajants L., Palamarchuk A. Ukrainian Wheat Pool. — *The World Wheat Book A History of Wheat Breeding.* — Paris — New York. — 2001. — P. 1107–1116.
582. Цицин Н. В. Отдаленная гибридизация — важнейший фактор формообразования // *Отдаленная гибридизация растений.* — М.: Наука, 1978. — С. 10–18.
583. Цицин Н. В., Петрова К. А. Пшенично-элимусные амфидиплоиды // *Гибриды отдаленных скрещиваний.* — М.: АН СССР, 1963. — С. 97–103.
584. Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А., Максимов Н. Г. Преодоление несовместимости при отдаленной гибридизации хлебных злаков // *Труды 1<sup>го</sup> Съезда генетиков и селекционеров Украины.* — К.: Наукова думка, 1981. — С. 165–167.

585. Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А., Максимов Н. Г., Наволоцкий В. Д. Получение гаплоидов ячменя при гибридизации с *Hordeum bulbosum* // I Сибирская конф. «Актуальные вопросы по генетике и селекции». — Барнаул, 1980. — С. 49.
586. Созинов А. А., Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А. Использование метода культуры изолированных органов и тканей в создании исходного материала для селекции // Селекция и семеноводство. — 1981. — Т. 48. — С. 3–8.
587. Орловская О. А. Особенности интрогрессии генетического материала *Aegilops* в геном тритикале: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / Ин-т генетики и цитологии Беларуси. — Минск, 2002. — 20 с.
588. Bajaj Y. P. S., Gill K. S. Sandha G. S. Some factors enhancing the in vitro production of hexaploid triticale (*Tr. aestivum* x *S. cereale*) // Crop. Improv. — 1978. — Vol. 5, № 1. — P. 62–72.
589. Лукьянюк С. Ф., Паламарчук А. И., Максимов Н. Г., Игнатова С. А. Гибридизация и формообразовательный процесс при отдаленных скрещиваниях (Тритикале,  $2n = 42 \times T. durum$ ) с использованием эмбриокультуры // Всесоюз. совещание «Роль отдаленной гибридизации в эволюции и селекции пшеницы». — Тбилиси, 1985. — С. 44–45.
590. Максимов Н. Г., Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А., Максимова В. И., Сулима Ю. Г., Костанди Г. В. Генетические особенности опыления и образования гибридных семян в реципрокных скрещиваниях гексаплоидных тритикале с мягкой пшеницей // Всесоюз. совещание «Цитолого-эмбриологические и генетико-биохимические основы опыления и оплодотворения растений». — Киев: Наукова думка, 1982. — С. 104–105.
591. Паламарчук А. И., Махновская М. Л., Игнатова С. А. Изучение возможности использования методов биотехнологии в селекции озимой твердой пшеницы // Доклады Российской Академии с/х наук. — 1995. — № 6. — С. 7–9.
592. Махновская М. Л., Сечняк А. Л., Игнатова С. А., Симоненко В. К. Разработка условий получения регенерантов из незрелых зародышей пшенично-ржаных гибридов // Физиология и биохимия культурных растений. — 1994. — Т. 26, № 4 (153). — С. 584–587.
593. Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 3. Каллусообразование in vitro // Биополимеры и клетка. — 1997. — Т. 13, № 5. — С. 362–371.
594. Scowcroft W. R., Larkin P. J. Genetic variation from tissue culture // Use of tissue culture and protoplast in plant pathology. I. P. Helgeson, B. J. Deverale (Eds) Academic Press Sydney, London, Toronto. — 1983. — P. 139–159.
595. Wenzell G., Foroughi-Wehr B. 21. In vitro selection // Plant Breeding-Principles and prospects. M. D. Heywood Ed. London. — 1983. — P. 353–370.
596. Redway F. A., Vasil V., Lu D., Vasil I. K. Identification of callus types for long-term maintenance and regeneration from commercial cultivars of wheat (*Tr. aestivum*) // Theor. Appl. Genet. — 1990. — Vol. 79, № 5. — P. 609–617.
597. Rangaswamy N. S. Somatic embryogenesis in angiosperm cell tissue and organ cultures // Proc. Indian Acad. Sci. — 1986. — Vol. 96, № 4. — P. 247–271.
598. Бутенко Р. Г., Джардемалиев Ж. К., Гаврилова Н. Ф. Регенерация растений из каллусных тканей, полученных из разных органов озимой пшеницы // Физиология растений. — 1986. — Т. 33, № 5. — С. 837–842.
599. Литовкин К. В. Генотипові особливості морфогенетичних реакцій в культурі тканин ячменю: Автореф. дис. ... канд. біол. наук: 03.00.20 / Ялта. Ботан. Сад. — Ялта, 2003. — 20 с.
600. Green C. E. In vitro Plant regeneration in cereals and grasses // Frontiers of Plant Tissue Culture. — 1978. — Univ. of Calgary. — 1978. — P. 411–413.
601. Botti C., Vasil I. K. The ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum* L. // Canad J. Bot. — 1984. — Vol. 62. — P. 1629–1635.
602. Vasil I. K. Somatic embryogenesis and its consequences in the Gramineae // Tissue culture in Forestry and Agriculture New York, London. — 1985. — P. 31–47.
603. Kamo K. K., Chang K. L., Hodges T. K. Regeneration of *Zea mays* L. from embryogenic callus // Bot. Gaz. — 1985. — Vol. 146, № 3. — P. 327–334.
604. Лукьянюк С. Ф., Александрова Л. Г., Игнатова С. А. Зависимость индукции каллусогенеза от дозы дедифференциатора // Всесоюз. конф. «Биотехнология злаковых культур». — Алма-Ата, 1988. — С. 69.
605. Hanzel J. J., Miller J. P., Brinkman M. A., Fendos E. Genotype and media effect on callus formation and regeneration in barley // Crop. Sci. — 1985. — Vol. 25. — P. 27–31.

606. Игнатова С. А., Коваленко П. В., Линчевский А. А., Овсяк Т. Н. Генотипические особенности получения растений-регенерантов ячменя в культуре // Междунар. конф. «Агробиотехнология растений и животных». — Киев: Наукова думка, 1997. — С. 96–97.
607. Игнатова С. О., Коваленко П. В., Овсяк Т. М. Особливості морфогенезу у ярого ячменю *in vitro* // Збірник наукових праць СГІ. — Одеса, 1999. — Вип. 1(41). — С. 17–21.
608. Коваленко П. В., Игнатова С. А., Чуйко Л. А. Особенности влияния препарата Силард на морфогенез злаков в культуре *in vitro* // Межд. конф. «Молекулярная генетика и биотехнология». — Минск, 1998. — С. 202–204.
609. Литовкин К. В., Игнатова С. А., Бондарь Г. П. Морфогенез в культуре незрелых зародышей изогенных линий ячменя // Цитология и генетика. — 1999. — Т. 33, № 5. — С. 14–19.
610. Литовкин К. В., Игнатова С. А. Влияние генотипа на морфогенез в культуре тканей ячменя // 2-я Межд. конф. «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве, ветеринарии». — Москва, 2000. — С. 31–33.
611. Літовкін К. В., Ігнатова С. О., Бондар Г. П. Кореляції між регенераційною спроможністю в умовах *in vitro* // Аграрний вісник Причорномор'я. Біологічні та сільськогосподарські науки. — 2001. — Вип. 12. — С. 25–29.
612. Игнатова С. А., Лукьянюк С. Ф. Индукция тетраплоидных растений из соматических тканей *Hordeum vulgare* // III Всесоюз. конф. «Культура клеток растений». — Абовян. — 1979. — С. 126.
613. Беломыльцева Е. В., Тоцкий В. Н., Игнатова С. А. Получение морфогенного каллуса из зрелых зародышей ячменя // Научно-технический бюллетень ВСГИ. — Одесса, 1991. — № 2 (79). — С. 39–43.
614. Lupotto E. Callus induction and plant regeneration from barley mature embryos // Annals of Bot. Company. — 1984. — Vol. 54. — P. 523–529.
615. Карабаев М. Культивируемые клетки пшеницы и кукурузы: Физиологические и биотехнологические аспекты: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.12 / Ин-т физиол. растений им. Тимирязева. — М., 1994. — 49 с.
616. Джардемалиев Ж. К. Биотехнологические аспекты регенерации растений в культуре клеток и протопластов пшеницы: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Ин-т микробиологии. — Ташкент, 1994. — 27 с.
617. Литвиненко М. А., Білецький В. А., Ігнатова С. О. Соматична регенерація у різних гібридів ярої м'якої пшениці // Науково-технічний бюлетень СГІ. — Одеса, 1995. — № 1 (86). — С. 30–33.
618. Белецкий В. А., Литвиненко Н. А., Махновская М. Л., Игнатова С. А. Регенерационная способность каллусных культур незрелых гибридных зародышей яровой мягкой пшеницы // Научно-технический бюллетень СГИ. — Одесса, 1997. — № 1 (87). — С. 25–31.
619. Machnovskaya M. L., Ignatova S. A. The embryogeny and regeneration in culture of immature embryos of winter durum and bread wheat // Abstr. Report. II Intern. Conf. Biology of Plant Cell Cultures and Biotechnology. — Almata. 1993. — P. 14.
620. Бабаянц Л. Т., Гонтаренко О. В. Комплексная оценка устойчивых генотипов пшеницы к фузариозу колоса: Методическое руководство СГИ. — 1994. — 23 с.
621. Гонтаренко О. В. Фузариоз колоса пшеницы в условиях юга Украины // Методы интенсификации селекционного процесса. — Одесса: ВСГИ, 1990. — 76 с.
622. Мазур А. А., Игнатова С. А., Бабаянц О. В. Влияние фильтрата культуральной жидкости гриба *Fusarium graminearum* Shwabe на прорастание зародышей пшеницы в культуре *in vitro* // Вестник ОНУ. — 2006. — Т. 11, № 6. — С. 13–20.
623. Мазур А. Я., Игнатова С. А. Критерии выявления устойчивых к фильтратам культуральной жидкости *Fusarium graminearum* форм в культуре изолированных зародышей и каллусов мягкой пшеницы // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: Зб. наукових праць. — Київ-Логос, 2007. — Т. 2. — С. 524–525.
624. Игнатова С. А., Бабаянц О. В. Методические основы отбора форм пшеницы мягкой, устойчивых к *Fusarium graminearum* Shwabe в условиях *in vitro*. Наукові праці Південного філіалу «Кримський Агротехнологічний університет Національного аграрного університету», с/х науки, в.107. — Сімферополь, 2008. — С. 136–141.
625. Schenk R. U., Hildebrandt A. Medium and technique for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures // Can. J. of Bot. — 1972. — Vol. 50. — P. 199–204.

626. Способ получения растений-регенерантов эспарцета: А. с. 1630707 СССР, МКИ А 01 Н 4/00 / Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А. (СССР). — № 44847464; Заявлено 05. 08. 88; Опубл. 28.02.91, Бюл. № 8. — 3 с.
627. Игнатова С. А. Прогнозирование устойчивости мягкой пшеницы к фузариозу колоса (*Fusarium graminearum* Shwabe) и отбор толерантных форм в условиях *in vitro*. — Геном рослин: 36. научных статей. — Одеса, 2008. — С. 187–191.
628. Шепель Л. С. Морфогенез в культуре *in vitro* різних експлантів ярого ячменю (*H. vulgare* L.) і одержання форм, стійких до борошністої роси (*Erysiphe graminis* Ds. FSP *Hordei* Marchal). — Автореферат дис. ... канд. біол. наук / 03.00.20. — Ялта, 2007. — Біотехнологія.
629. Ahuja P. S., Lu D. J., Cocking E. C., Darvey M. R. An assesement of the cultural copabilities of *Trifolium repens* L. (white clover) and *Onobrychis viciifolia* Scop. (sainfoin) mesophyll protoplasts // *Plant/genetic Manipulation Group*. — Nottingham. — 1983. — № g7. 2RD. — P. 15–20.
630. Мезенцев А. В., Карелина Н. А. Влияние генотипических особенностей люцерны на каллусообразование и соматический эмбриогенез при различных условиях культивирования тканей // *Генетика*. — 1982. — Т. 17, № 6. — С. 999–1003.
631. Binarova P., Novak F. J. Regeneration and somatic embryo development in cell culture of alfalfa (*Medicago sativa* L.) // *Plant Tissue and Cell Culture: Olomouc*. 1984. Ed. Novak F. I. et al. Prague Czech. Acad. Sci. — 1984. — P. 139–141.
632. Atanassov A. I., Brown D. C. W. Plant regeneration from suspension culture and mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* L. // *Plant Cell Tissue Organ Culture*. — 1984. — Vol. 3. — P. 149–162.
633. Tadaschi Takamizo, Ken-ichi Sugino, Ryu Ohsugi. Somatic embryogenesis in recalcitrant cultivar of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) in an improved medium // *Bull. National grassland research Inst. Japan. Tochigi*. — 1991. — Vol. 44. — P. 15–21.
634. Novak F. J., Konecna D. L. Somatic embryogenesis in callus and cell suspension cultures of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) // *Z. Pflanzenphysiol.* — 1982. — Vol. 105. — P. 279–284.
635. Ahloowalia B. S. Chromosomal changes in paraxenally produced ryegrass // *Current chromos. Research*. Amsterdam. — 1976. — P. 115–122.
636. Ahloowalia B. S. Limitations to the use of somaclonal variation in crop improvement // *Somaclonal variations and crop improvement* I. Semal (Ed). Dordrecht. Boston. Lancaster. — 1986. — P. 14–28.
637. Ahuja P. S., Pental D., Cocking E. C. Plant regeneration from leaf base callus and cell suspensions of *Triticum aestivum* // *Z. Pflanzenzuchtg.* — 1982. — Vol. 89. — P. 139–144.
638. Saunders J. W., Bingham E. T. Growth regulator effects on bud initiation in callus cultures of *Medicago sativa* // *American J. of Botany*. — 1975. — Vol. 62, № 8. — P. 850–855.
639. Forster B. P., Packnijat H., Simpson C. G., Handey L. L. Genetic control of salt tolerance in barley // *Proc. Int. Symp. Vienna*. — 1995. — P. 347–353.
640. Schachtman D. P., Lagudah E. S., Munus R. The expression of salt tolerance from *Triticum tauschii* in hexaploid wheat // *Ibid.* — 1982. — Vol. 84, № 516. — P. 714–719.
641. Коваль В. С., Коваль С. Ф. Генетический анализ солеустойчивости ячменя. Определение числа генов // *Генетика*. — 1996. — Т. 32, № 8. — С. 1098–1103.
642. Sarange J., Cahaner A., Zamir D., Marani A., Rudich I. Breeding tomatoes for salt tolerance: inheritance of salt tolerance and related traits in interspecific populations // *Theor. Appl. Genetic*. — 1982. — Vol. 84, № 314. — P. 390–396.
643. Prakash L., Pratapasenang G. Interactive effect of NaCl salinity and putrescine on shoot growth and activity of IAA oxidase, invertase and amilase of rice // *Biochem. Physiol Pflanz*. — 1989. — Vol. 184, № 132. — P. 69–78.
644. Gregorio G. B., Senadhira D. Genetic analysis of salinity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) // *Theor. Appl. Genetic*. — 1993. — Vol. 86, № 213. — P. 333–338.
645. Bressan R. A., Hasegawa P. M., Handa A. K. Resistance of cultured higher plant cell to polyethylene glycol-induced water stress // *Plant Sci. Lett.* — 1981. — Vol. 21. — P. 23–30.
646. Harms C. T., Oertli J. J. The use of osmotically adapted cell cultures to study salt in vitro // *Plant Physiol.* — 1985. — Vol. 120. — P. 29–38.
647. Amzallag G. N., Lerner H. R., Rolianoff-Mayber A. Exogenous ABA as a modulator of the response of *Sorghum* to high salinity // *Ibid.* — 1990. — Vol. 41, № 233. — P. 1529–1534.
648. Удовенко Г. В. Солеустойчивость культурных растений. — Л.: Колос, 1977. — 255 с.

649. Nabors M. W., Daniels A., Nadolny L., Brown C. Sodium chloride tolerant lines of tobacco cells // *Plant Sci. Lett.* — 1974. — Vol. 4. — P. 155–159.
650. Nabors M. W., Gibbs S. E., Bernstein C. S., Meis M. E. NaCl tolerant tobacco plants from cultured cell // *Z. Pflanzenphysiol.* — 1980. — Vol. 97. — P. 13–17.
651. Orton T. I. Salt tolerance in *Hordeum vulgare* and *H. jubatum* // *Z. Pflanzenphysiol.* — 1980. — Vol. 98. — P. 105–108.
652. Xiao Halin, Zhao Shizu. Отбор в культуре тканей пшеницы мутантов, выносливых к NaCl // *Acta agr. nucl. sin.* — 1989. — Vol. 3, № 2. — P. 85–90.
653. Zhuping Gu, Guochang Zheng. Selection for salt tolerant callus of sainfoin by radiation of salt neutron and culture on medium containing salt // *Joint Meet. Can. Bot. Assoc. Toronto.* — 1989. *Amer. J. Bot.* — 1989. — Vol. 76, № 6. Suppl. — P. 42.
654. Me Hughen A. G., Swartz M. A tissue culture derived salt tolerant line of flax (*Linum usitatissimum*) // *Plant Physiol.* — 1984. — Vol. 117. — P. 109–117.
655. Bazakat M. N., Abdel-Latif T. H. In vitro selection of wheat callus tolerant to high levels of salt and plant regeneration // *Eiphytica.* — 1996. — Vol. 91, № 2. — P. 127–140.
656. Narayanan K. K., Kangasamy S. R. Inheritance of salt tolerance in progenies of tissue culture selected variants of rice // *Curr. Sci. (India).* — 1989. — Vol. 58, № 21. — P. 1204–1205.
657. Lupotto E., Lusardi M. C., Mongodi M. In vitro selection of maize (*Zea mays* L.) salt tolerant somaclones and plant regeneration // *J. Genet. And Breed.* — 1989. — Vol. 43, № 4. — P. 215–222.
658. Freytag A. H., Wrather J. A., Erichsen A. W. Salt tolerant sugarbeet progeny from tissue cultures challenged with multiple salts // *Plant Cell Repts.* — 1990. — Vol. 8, № 11. — P. 647–650.
659. Winicov I. Salt tolerance in alfalfa gene activation in salt tolerant callus and plant regenerated from salt tolerant callus. — 1990. — Suppl. 14 E. — P. 312–316.
660. Chandler S. F., Thorpe T. A. Variation from plant tissue cultures: biotechnological application to improving salinity tolerance // *Biotechnol. ADV.* — 1986. — Vol. 4, № 1. — P. 117–135.
661. Беломыльцева Е. В., Игнатова С. А., Линчевский А. А. Изменчивость морфометрических признаков у регенерантов ячменя // *Научно-технич. бюлетень СГП.* — Одеса, 1992. — № 2 (82). — С. 35–38.
662. Беломыльцева Е. В., Тоцкий В. Н., Игнатова С. А. Селекция ячменя в каллусных и суспензионных культурах на устойчивость к засолению // *IV Всесоюз. конференция «Экологическая генетика растений, животных и человека».* — Кишинев: Штиинца, 1991. — С. 402.
663. Byther R. S., Steiner G. W. Use of helminthosporoside to select sugarcane seedlings resistant to eye spot disease // *Phytopathology.* — 1972. — Vol. 62 — P. 132–136.
664. Heinz D. J., Krishnamurthi M., Nickell L. G., Maretzki A. Cell, tissue and organ culture in sugarcane improvement // *Appl and Fundamental aspects of Plant Cell Tissue and organ Culture.* Reinert J., Bajaj Y. P. S. (Eds). Berlin, Springer. — 1977. — P. 231–243.
665. Gengenbach B. G., Green C. E., Donovan C. M. Inheritance of selected pathotoxin resistance in maize plant regenerated from cell cultures // *Proc. Nat. Acad. Sci USA.* — 1977. — Vol. 71, № 11. — P. 199–221.
666. Dutrecq A. Studies of the effects of toxic preparations of *Helminthosporium sativum* on barley and wheat and perspectives of in vitro selection of these cereals // *Agronomie.* — 1981. — Vol. 1, № 3. — P. 121–129.
667. Мезенцев А. В., Любавина Л. А., Корелина Н. А. Культура клеток в селекции клевера и люцерны // *Доклады ВАСХНИЛ.* — 1982. — № 7. — С. 17–22.
668. Bajaj Y. P. S., Phul P. S., Sharma S. K. Different tolerance of tissue cultures of pearl-millet to ergot extract // *Indian J. Exp. Biol.* — 1980. — Vol. 18, № 4. — P. 131–135.
669. Pierre Auriol, Branchard M. Studies on the *Rhynchosporium secalis*-*Hordeum vulgare* couple: a host-parasite relationship original approach // *4-th Barley Genet. Symp. Edinburg. Abstr.* — 1981. — P. 81.
670. Волощук С. І., Волощук Г. Д., Гирко В. С. Використання технологій *in vitro* в селекції пшениці на стійкість до грибних патогенів. — *Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть.* — Київ: Логос, 2001. — Т. 1. — С. 625–635.
671. Бавол А. В. Клітинна селекція м'якої пшениці на стійкість до *Gaeumannomyces Graminis* var. *Triticis*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 / Інститут фізіол. росл. і ген. НАНУ. — Київ, 2009.
672. Дениско Т. В., Игнатова С. О., Бабаянц О. В. Розробка умов *in vitro* для прогнозування толерантності м'якої пшениці до грибів різних видів роду *Alternaria* Nees // *Актуальні проблеми*

- прикладної генетики, селекції та біотехнології рослини. 36. наук. праць. — Ялта, 2009. — Т. 131. — С. 156–160.
673. Дениско Т. В., Игнатова С. О. Розробка умов *in vitro* для прогнозування толерантності м'якої пшениці до грибів різних видів роду *Alternaria Nees* // Actual Problems of Applied Genetics, Breeding and Biotechnology of Plants. Abstracts, Yalta, Ukraine, 2009, p.116.
674. Yan Z., Cuilan Z., Yuwen W., Shuxin R. Scab-resistant wheat breeding by cell engineering // Proc. Of Inter Symp. Breeding Prospects and Future Approaches. Albena. Bulgaria. — 1990. — P. 136–138.
675. Lu W., Cheng S., Shen X., Zhou M., Wang Y., Yao G. Utilization of biotechnology in genetic improvement of wheat for scab-resistance // 9-th Intern. Wheat genet. Symp. Proc. Canada. — 1998. — Vol. 3. — P. 135–137.
676. Способ селекции люцерны на устойчивость к инфекционным заболеваниям: А. с. 1323046 СССР, МКИ А 01 Н 1/04 / Игнатова С. А., Овсяк Т. Н., Лукьянюк С. Ф. (СССР). — № 3841439; Заявлено 15.03.87; Опубл. 30.07.87, Бюл. № 2в. — 2 с.
677. Мазур А. Л., Игнатова С. А. Определение сублетальных концентраций филтраты *Fusarium graminearum Shwabe* для получения устойчивых форм мягкой пшеницы в культуре *in vitro* // Фактори експериментальної еволюції організмів. — К.: Логос, 2006. — С. 484–489.
678. Плащев В. М. Клеточная селекция клевера и люцерны в создании устойчивых к болезням форм растений // Труды Всесоюзной школы молодых ученых и специалистов «Биологические методы в интегрированной защите с/х культур от вредителей, болезней, сорняков». — Кишинев: Штиинца, 1985. — С. 74.
679. Binarova P., Nedelnik J., Fellner M., Nedbalkova B. Selection for resistance to filtrates of *Fusarium* spp. In embryogenic cell suspension culture of medicago sativa L. // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. — 1990. — Vol. 22. — P. 191–196.
680. Игнатова С. А., Овсяк Т. Н., Лукьянюк С. Ф., Сечняк Л. К. Использование культуры тканей люцерны для создания форм, устойчивых к фузариозу // Труды Межд. конф. «Биология культивируемых клеток и биотехнология». — Новосибирск, 1988. — Том 1. — С. 175–176.
681. Игнатова С. А., Овсяк Т. Н. Прием клеточной селекции в получении фузариозоустойчивых растений люцерны // Международный агропромышленный журнал СЭВ. — 1989. — № 5. — С. 95–100.
682. Методические указания по регенерации и размножению люцерны с использованием культуры тканей, клеток и протопластов. ВАСХНИЛ. — Москва, 1980. — 24 с.
683. Игнатова С. А., Овсяк Т. Н., Лукьянюк С. Ф. Создание исходного фузариозоустойчивого материала люцерны с использованием биотехнологических приемов // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений / Ред. Р. Г. Бутенко. — Москва: Наука, 1991. — С. 137–141.
684. Игнатова С. А., Овсяк Т. Н., Лукьянюк С. Ф., Сечняк Л. К. Использование культуры тканей люцерны для создания форм, устойчивых к фузариозу // Труды Международной конференции «Биология культивируемых клеток и биотехнология». — Новосибирск, 1988. — Том 1. — С. 175–176.
685. Игнатова С. А., Овсяк Т. Н., Лукьянюк С. Ф. Скрининг соматических вариантов люцерны на устойчивость к фузариозу // Всесоюз. конф. «Генетика соматических клеток в культуре, посвященная памяти Н. И. Шапиро». — Москва, 1989. — С. 44–45.
686. Ignatova S., Ovsjuk T., Lucjunjuk S. Elaboration of the principles of Alfalfa cell breeding for resistance to *Fusarium* // Proc. Eucarpia. sativa group meeting. Komplot — Hungary. — 1991. — P. 184–187.
687. Santos A. V. P., Dos P. Origin and development of somatic embryos *Medicago* // Protoplasma. — 1983. — Vol. 117, № 2. — P. 107–115.
688. Гирко В. С. Нетрадиційні методи створення селекційного матеріалу пшениці: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук: 06.01.05 / Ін-т землеробства УААН. — К., 1999. — 34 с.
689. Редько В. И., Редько В. В., Сахно Л. А. Реакция меристем сахарной свеклы на солевой стресс // Биотехнологические методы в селекции сахарной свеклы. — М.: Наука, 1989. — С. 27–32.
690. Белявский Ю. В. Получение устойчивых к *Fusarium* и *Verticillium* исходных форм люцерны: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 06.01.11/ Ин-т защиты растений. — Л., 1990. — 18 с.
691. Ahmad K., Mesterhazy A., Bartok T. In vitro techniques for selecting wheat (*Tr. aestivum*) for *Fusarium* resistance. II Culture filtrate technique and inheritance of *Fusarium* resistance in the somaclones. — Euphytica. — 1966. — Vol. 91, № 3. — P. 341–349.
692. Внучкова В. А., Аш О. А. Об использовании селективных сред для создания *in vitro* форм пшеницы, устойчивых к корневой гнили // С/х биология. — 1992. — № 3. — С. 52–55.

693. Шевелуха В. С., Рогинская В. А., Хижняк С. В. Перспективы использования токсинов возбудителя обыкновенной корневой гнили зерновых в клеточной селекции // С/х биология. — 1992. — № 3. — С. 45–51.
694. Батыгина Т. Б. Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей // Физиология растений. — 1999. — Т. 46, № 6. — С. 834–898.
695. Кабузенко С. М. Вплив засолення і екзогенних фітогормонів на ріст та деякі фізіолого-біохімічні функції рослин на ранніх етапах онтогенезу: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук: 03. 00.12 / Симф. держ. у-т. — Київ, 1997. — 46 с.
696. Лукьянюк С. Ф., Игнатова С. А. Методы культуры тканей и органов в селекции растений: Методические рекомендации. ВСГИ. — Одесса, 1980. — 21 с.
697. Tomoaki Taira, Larter E. N. Effects of  $\epsilon$ - amino-caproic and l-lysine on the development of hybrid embryos of triticale ( $\times$  Triticosecale) // Can. J. Bot. — 1977. — Vol. 55, № 17. — P. 2330–2334.
698. Билай В. И. Фузарии. — К.: Наукова думка, 1997. — 320 с.
699. Игнатова С. О. Реалізація тотипотентності мікроспор в культурі *in vitro* та її використання в селекційно-генетичних експериментах // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. — К.: Логос, 2001. — С. 562–572.
700. Задерей Н. С., Игнатова С. А., Шестопал О. Л. Прогнозирование способности к гаплопродукции мягкой пшеницы в культуре пыльников // Мат. Межд. симп. «Молекулярные механизмы генетических процессов и биотехнология». Москва — Минск. 2001. — С. 369–370.
701. Паушева З. П. Практикум по цитологии растений. — М.: Агропромиздат, 1988. — 271 с.
702. Кордюм Е. Л. Эволюционная цитоэмбриология покрытосеменных растений. — К.: Наукова думка, 1978. — 219 с.
703. Moore S. Spackman D. H., Stein W. H. Chromatog of amino acid on sulfonated polestesterene resins Anal. // Chem 1958. — Vol. 30. — P. 1185–1189.
704. Шамина З. Б. Методические указания по клеточной селекции. — М.: Ин-т физиологии растений АН СССР, 1984. — 36 с.
705. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — Минск: Вышэйшая школа, 1967. — 326 с.
706. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. — 351 с.

**Адвентивные почки** — почки на растениях, возникающие из клеток и тканей, обычно их не образующих.

**Аддитивный эффект**, аддитивное действие генов — суммарное действие генов на определённый признак, суммарное проявление полимерных генов в одном признаке. Также кумулятивное действие всех локусов, которые контролируют доминирование определённого количественного признака.

**Андрогенез** — развитие гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных пыльников или микроспор.

**Анеуплоид** — организм, клетки которого содержат число хромосом, не кратное типичному гаплоидному набору.

**Апекс** — верхняя часть ростка и корня растения.

**Апикальное доминирование** — коррелятивное торможение верхушкой побега или корня развития соответственно пазушных почек или боковых корней.

**Биотехнология** — наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования биотехнических объектов для интенсификации производства или получения новых видов продуктов различного назначения или нового генетического материала.

**Гаметная селекция** — отбор желаемых генотипов растений на уровне мужского или женского гаметофита.

**Гаметоклональная изменчивость** — генотипическая и фенотипическая изменчивость, наблюдаемая среди регенерантов в культуре пыльников, микроспор, женского гаметофита.

**Гаметы** — половые клетки с гаплоидных наборов хромосом.

**Гаплоид** — особь, несущая одинарный или гаплоидный набор непарных хромосом.

**Геммогенез** — образование (дифференциация) почек в каллусных культурах.

**Ген** — основная физическая и функциональная единица наследственности, специфическая последовательность нуклеотидов в ДНК (у некоторых вирусов — в РНК), детерминирующих или нуклеотидную последовательность транспортных РНК либо рибосомальных РНК, или последовательность аминокислот в белке.

**Генотип** (идиотип) — совокупность наследственных факторов организма или клетки. Состоит из генома, плазмона и пластомы.

**Генетическая инженерия** — генетическое конструирование новых форм биологически активных ДНК, генетически новых форм клеток и целых организмов с помощью искусственных приемов переноса генов (технологии рекомбинантных ДНК, генетической трансформации клеток).

**Генная инженерия** — раздел генетической инженерии, включающий технологию рекомбинантных молекул, выделение, конструирование новых рекомбинантных генов, создание банка генов и др.

**Геном** — совокупность гаплоидного набора хромосом данного вида организмов.

**Гетерозис** — превосходство гибридов F1 по определенным признакам над лучшей из родительских форм.

**Гетерозигота** — клетка или организм, которые содержат два разных аллеля в локусе гомологичных хромосом.

**Гормон** — химическое соединение, образующееся в малых количествах в одной части растения, обычно транспортирующееся в другую его часть и вызывающее специфический ростовой или формообразовательный эффект.

**Дедифференциация** — переход специализированных неделящихся клеток к образованию недифференцированных каллусных клеток.

**Диплоид** — организм с двумя гомологичными наборами хромосом (2n).

**Дифференциация** — возникновение функциональных и структурных отличий у различных клеток и тканей организма в процессе его развития.

**ДНК** — высокомолекулярный полимер, состоящий из четырех дезоксирибонуклеотидов (А, Т, G, Ц), аperiodическим чередованием которых кодируется генетическая информация организмов.

**Зигота** — оплодотворенная яйцеклетка.

**Каллус** — неорганизованная масса ткани, состоящая из дедифференцированных (утративших специализацию) клеток.

**Клеточная селекция** — отбор естественных или индуцированных мутантов *in vitro* на клеточном уровне в селективных условиях с последующей регенерацией растений.

**Клеточная линия** — клеточная культура, которая образовалась из штамма методом селекции или клонирования и имеет маркерные признаки.

**Клон** — 1) организм или популяция клеток, полученных из одной или группы идентичных клеток при бесполом размножении; 2) последовательности ДНК, полученные многократно при помощи методов генетической инженерии.

**Клональное микроразмножение** — способ вегетативного размножения растений на основе культуры *in vitro*.

**Клонирование** — получение клонов (организм, группа клеток, ген). Различают клонирование генов — выделение и амплификация отдельных генов в реципиентных клетках, а также молекулярное клонирование — размножение молекул ДНК в составе вектора.

**Компетентность** — 1) способность клеток реагировать на определенный гормон, связанная с синтезом в клетках белка-рецептора; 2) физиологическое состояние клеток, определяющее способность воспринимать трансформирующую ДНК.

**Культура зародышей** — стерильное выращивание на искусственных питательных средах незрелых или зрелых изолированных зародышей.

**Культура клеток** (суспензионная культура) — выращивание отдельных клеток или их малых групп во взвешенном состоянии в жидкой среде при использовании аппаратуры, которая обеспечивает аэрацию и перемешивание среды.

**Меристема** — образовательные ткани с активно делящимися клетками, из которых образуются все постоянные ткани организма. У растений выделяют несколько типов меристем — апикальные (верхушечная ткань стебля и корня), латеральная и интеркалярная (размещены между участками тканей, например в междоузлиях и основаниях листа).

**Мейоз** — процесс деления половых клеток, приводящий к редукции (уменьшению) числа хромосом, рекомбинации генов и образованию гамет.

**Микориза** — симбиоз мицелия гриба и корней высшего растения.

**Морфогенез** — заложение, рост и развитие специализированных клеток, тканей и органов у растений, сопровождающийся дифференциацией.

**Незаменимые аминокислоты** — аминокислоты, которые не синтезируются в организме человека.

**Нуклеиновая кислота** — универсальный полимер, хранящий и передающий генетическую информацию. Одно или двунитевый ли-

нейный полинуклеид, содержащий дезоксирибонуклеотиды (ДНК) или рибонуклеотиды (РНК), связанные 3–5–фосфодиэфирными связями.

**Онтогенез** — комплекс последовательных и необратимых изменений жизнедеятельности и структуры растения от его возникновения из оплодотворенной яйцеклетки или вегетативной почки и до естественной смерти. Онтогенез является последовательной реализацией наследственной программы развития организма в конкретных условиях внешней среды.

**Органогенез** — образование монополярной структуры, т. е. отдельных органов, из меристем (корней, стеблей, режы цветков или листьев). Органогенез может происходить непосредственно в ткани экспланта (прямой) или через стадию каллуса (непрямой).

**Пассирование** — перенос культивируемой части растения или культуры клеток и тканей на свежую питательную среду.

**Популяция клеток** — совокупность культивируемых клеток одного штамма или клеточной линии.

**Рекомбинация** — комбинация генов у потомков (молекул, клеток, организмов), которые отличаются от комбинации их родителей. Природный процесс рекомбинации используют для клонирования ДНК, вследствие чего получают рекомбинантные (гибридные) ДНК и отдельные гены.

**Регенерация** — образование отдельных тканей, органов или целых организмов вследствие морфогенеза в культуре изолированных тканей. Также обновление утраченных или повреждённых органов, тканей, целого организма из его частей.

**Ризогенез** — образование корней (проростками, регенерантами, каллусными клетками).

**Соматоклональные варианты** — проявление фенотипической, ядерной и цитоплазматической изменчивости в культуре *in vitro* у клеток и регенерантов растений. От настоящих генных мутаций отличаются большей частотой возникновения и комплексностью изменений (в структуре и функционировании генов, хромосом, геномов).

**Селективная среда** — условия питательной среды в культуре *in vitro*, обеспечивающие отбор клеток с желательными признаками (главным образом устойчивостью к стрессам).

**Соматоклональная изменчивость** — генетическая изменчивость, наблюдаемая у растений, регенерированных из соматических клеток в культуре *in vitro*.

**Соматический эмбриогенез** — образование биполярных зародышеподобных структур (эмбриодов) из соматических клеток. Эмбриогенез может происходить в ткани экспланта (прямой) или через стадию каллуса (непрямой).

**Тотипотентность** — способность растения функционально восстанавливаться из части, органа или отдельной клетки. Или способность соматических клеток растений полностью реализовать свой потенциал развития или реализовать omnipotentность ядра с образованием целого организма; способность клеток растений фенотипически реализовать генетическую информацию, закодированную в ДНК ядра.

**Фитогормоны, гормоны растений** — физиологически активные вещества, которые образуются в растениях в очень малых количествах и регулируют их рост и развитие. К ним относят ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовую кислоту, этилен, а также брассиностероиды и жасминовую кислоту.

**Эксплант** — фрагмент ткани или органа, культивируемый на питательной среде *in vitro* самостоятельно или используемый для получения первичного каллуса.

**Эмбриод** — зародышеподобная структура, которая появилась путём соматического эмбриогенеза.

**Эмбриокультура** — выращивание изолированных зародышей на разных стадиях развития в культуре *in vitro*.

**In vitro** — культивирование части организма «в стекле, в пробирке» на искусственных питательных средах в асептических условиях.

У монографії викладено результати науково-дослідної роботи автора з удосконалення біотехнологічних систем *in vitro*, спрямованої на отримання вихідного матеріалу та прискорення селекції пшениці, ячменю, тритикале. У роботі розглядається коло питань, пов'язаних із реалізацією клітинами експлантів тотипотентності в культурі *in vitro*. Актуальність проведених досліджень полягає у вивченні комплексу факторів різної природи, що впливають на процеси диференціації, проліферації, шляхи морфогенезу та регенерації рослин. Результати досліджень є основою розроблених біотехнологій підвищення ефективності селекційного процесу важливіших сільськогосподарських культур.

Монографія призначена для спеціалістів у галузі біотехнології в рослинництві, може бути навчальним посібником для викладачів, аспірантів та студентів біологічних та сільськогосподарських вищих навчальних закладів.

*Наукове видання*

**ІГНАТОВА Світлана Олександрівна**

**КЛІТИННІ ТЕХНОЛОГІЇ  
У РОСЛИННИЦТВІ,  
ГЕНЕТИЦІ ТА СЕЛЕКЦІЇ  
ОБРОБЛЮВАНИХ РОСЛИН:  
ЗАВДАННЯ, МОЖЛИВОСТІ,  
РОЗРОБКИ СИСТЕМ *IN VITRO***

Монографія

*Російською мовою*

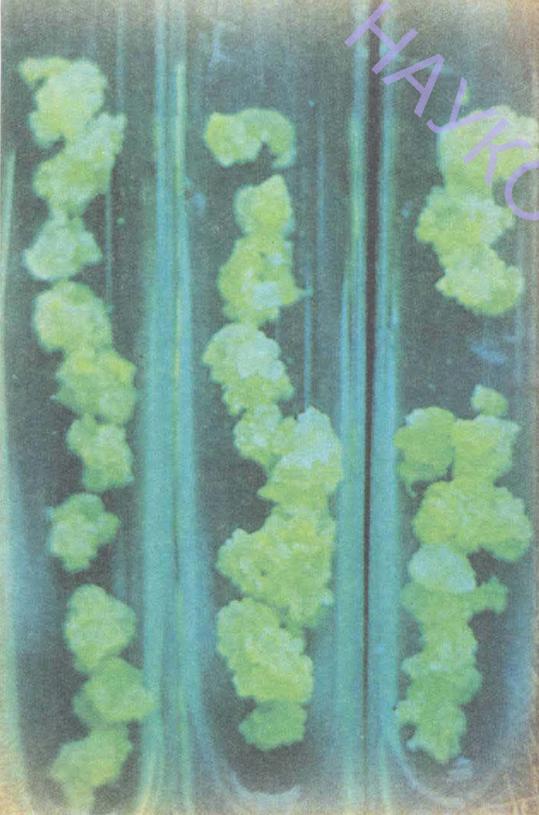
Завідувачка редакції *Т. М. Забанова*  
Редактор *Н. Я. Рихтік*  
Технічний редактор *М. М. Бушин*  
Дизайнер обкладинки *О. А. Кунтарас*  
Коректор *Л. М. Лейдерман*

---

Здано у виробництво 28.07.2011. Підписано до друку 02.09.2011.  
Формат 60x84/16. Папір офсетний. Гарнітура «Newton». Друк офсетний.  
Ум. друк. арк. 13,02. Тираж 300 прим. Вид. № 122. Зам. № 536.

Видавництво і друкарня «Астропринт»  
65091, м. Одеса, вул. Разумовська, 21  
Тел.: (0482) 37-07-95, 37-14-25, 33-07-17, (048) 7-855-855  
[www.astroprint.odessa.ua](http://www.astroprint.odessa.ua)  
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 1373 від 28.05.2003 р.

НАУКОВА БІБЛІОТЕКА ОНУ ІМЕНІ І. МЕЧНИКОВА



Нітанс-518

