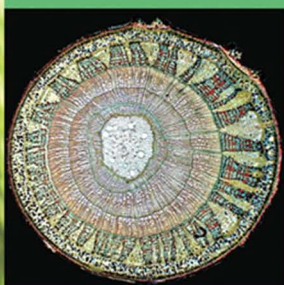


ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ

ТОМ **3**



Биотехнология
в селекции
растений
Клеточная
инженерия

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
Институт генетики и цитологии

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ

В четырех
томах



Минск
«Беларуская навука»
2008

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
Институт генетики и цитологии

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ

ТОМ **3**



Биотехнология
в селекции
растений
Клеточная
инженерия



Минск
«Беларуская навука»
2012

Генетические основы селекции растений. В 4 т. Т. 3. Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия / науч. ред. А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева. – Минск : Беларус. навука, 2012. – 489 с. – ISBN 978-985-08-1392-3.

Настоящий коллективный труд, подготовленный учеными Белорусского общества генетиков и селекционеров, выходит с 2008 г. и посвящен обобщению опыта применения генетических методов в совершенствовании частной селекции растений.

В третьем томе отражены результаты исследований по генетике морфогенеза *in vitro* у таких культур, как пшеница, томат, лен, ячмень и тритикале. Генетические исследования явления гаплоидии представлены работами по пшенице, томату, тритикале, картофелю, сахарной свекле. Освещены вопросы соматической гибридизации и селекции *in vitro* у картофеля. Отдельная глава представлена анализом данных по размножению *in vitro* плодовых и ягодных культур. Рассматривается использование методов гаметной селекции у самоопылителей – томата и люпина. Значительное место отведено результатам работы по клональному микроразмножению растений. В отдельной главе отражены результаты использования биотехнологических методов у лесных культур.

Монография рассчитана на научных работников в области генетики и селекции растений, преподавателей и студентов биологических и сельскохозяйственных вузов, специалистов сельского хозяйства.

Табл. 186. Ил. 94. Библиогр.: 1135 назв.

Научные редакторы:

доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси А. В. Кильчевский,
доктор биологических наук, профессор, академик Л. В. Хотылева

Рецензенты:

доктор биологических наук, профессор, академик В. Н. Решетников,
доктор биологических наук, профессор, академик Н. А. Ламан

*Издание подготовлено при участии
Белорусского общества генетиков и селекционеров*

ПРЕДИСЛОВИЕ РЕДАКТОРОВ

Уважаемый читатель!

Третий том коллективной монографии «Генетические основы селекции растений» охватывает исследования белорусских генетиков, выполненные с использованием биотехнологических методов и методов клеточной инженерии применительно к селекции растений.

В книге отражены результаты, полученные по генетике морфогенеза *in vitro* у таких культур, как пшеница, томат, лен, ячмень и тритикале. Генетические исследования явления гаплоидии представлены работами по пшенице, томату, тритикале, картофелю, сахарной свекле. Несомненный интерес представляют работы по соматической гибридизации и селекции *in vitro* у картофеля.

Существенно внимание уделено изложению результатов, полученных при использовании методов гаметной селекции у самоопылителей – томата и люпина, которые продемонстрировали несомненные преимущества по сравнению с традиционными методами отбора. Значительное место отведено результатам работы по клональному микроразмножению растений. Продemonстрированы преимущества клонального микроразмножения в сравнении с традиционными методами на культурах картофеля, плодовых, ягодных и декоративных растений. В отдельном разделе отражены результаты использования биотехнологических методов у лесных культур, которые представляют для Беларуси стратегический интерес. Обсуждаются растительно-микробные взаимодействия в селекции томата.

Возможности и перспективы использования методов биотехнологии и клеточной инженерии в селекции растений открывают новые пути увеличения производства продукции сельского и лесного хозяйства и повышения ее качества. Мы надеемся, что представленные в 3-м томе книги «Генетические основы селекции растений» результаты разносторонних исследований белорусских ученых не только познакомят читателя с направлениями и итогами их многолетней работы, но и будут способствовать более активному использованию в селекции методов биотехнологии и клеточной инженерии при создании новых сортов растений.

А. В. Кильчевский,
Л. В. Хотылева

Глава 1

КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ В ГЕНЕТИКЕ, СЕЛЕКЦИИ И СЕМЕНОВОДСТВЕ

Основой современной биотехнологии является генетическая и клеточная инженерия. Под клеточной инженерией растений понимают культивирование в асептических условиях среды вне организма (*in vitro*) изолированных клеток и тканей, а также различные манипуляции с ними (слияние, размножение и др.).

Культура клеток и тканей растений *in vitro* основана на трех принципах: 1) необходимости изолирования экспланта от материнского растения; 2) культивировании экспланта в регулируемых условиях, определяемых химическим составом питательной среды, а также физическими условиями; 3) выполнении всех работ по культивированию клеток и тканей в стерильных условиях.

Первые работы в области клеточной инженерии растений были выполнены Хаберландтом, Готрэ, Уайтом, Скугом и др. [1].

Значительный вклад в развитие клеточной инженерии внесли биотехнологи СНГ. Р. Г. Бутенко (Институт физиологии растений, Москва) создала научную школу по культуре изолированных тканей и физиологии морфогенеза растений *in vitro*. Ю. Ю. Глеба, В. А. Сидоров и др. (Украинский биотехнологический центр, Киев) выполнили цикл исследований по соматической гибридизации и клеточной селекции растений. Н. А. Картель и др. (Институт генетики и цитологии НАН Беларуси) изучили генетические основы процессов каллусогенеза и регенерации у растений [1–6].

С переходом на культивирование клеток биологи получили мощный инструментарий для изменения наследственности организмов, получения принципиально новых форм, разработки новых технологий в селекции, семеноводстве, защите растений, повышении плодородия почв, защите окружающей среды и др.

Кратко рассмотрим основные направления использования достижений клеточной инженерии.

1. В области селекции с переходом на клеточный уровень стало возможным вести клеточную и гаметную селекцию на устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам, преодолевать барьеры нескрещиваемости и создавать принципиально новые формы, несущие различные наборы ядерных и цитоплазматических генов, изменять уровень пloidности, ускорять селекционный процесс путем использования гаплоидов, сохранять генофонд в виде культуры клеток посредством криосохранения в жидком азоте. Следует также отметить, что технологии создания трансгенных растений, как правило, включают и культивирование клеток и тканей *in vitro*.

2. В области семеноводства создана индустрия производства оздоровленного от вирусов и других патогенов посадочного материала вегетативно размножаемых культур (картофель, плодовые, ягодные, овощные, декоративные, лесные растения).

3. В области защиты растений на основе достижений генной и клеточной инженерии получены растения, устойчивые к насекомым, вирусам, болезням и другим патогенам.

4. Принципиально новые возможности открываются в области защиты окружающей среды. Создание на основе генной и клеточной инженерии растений с максимальным накоплением поллютантов позволит извлекать их из загрязненного субстрата (почва, вода), а растения с минимальным накоплением дадут возможность получать экологически безопасную продукцию.

5. Культивирование новых растений – суперпродуцентов биологически активных веществ позволит более эффективно решать проблему создания и производства новых лекарств и препаратов для медицины и ветеринарии.

В настоящее время исследования в области клеточной инженерии растений в Беларуси выполняются в Институте генетики цитологии НАН Беларуси, Центральном ботаническом саду, Институте леса, Институте биофизики и клеточной инженерии, Институте экспериментальной ботаники, НППЦ по земледелию, НППЦ по картофелеводству и плодоовощеводству, Белорусском государственном университете, Белорусской государственной сельскохозяйственной академии и других учреждениях.

1.1. Генетические основы морфогенеза *in vitro*

Реализация генетической программы клетки в культуре *in vitro* происходит в результате морфогенеза – заложения, роста и развития органов, тканей и клеток у растений. Соматическая клетка обладает тотипотентностью, то есть способностью полностью реализовать свою программу развития и дать начало целому растению. В процессе дифференциации клеток и тканей растения между ними возникают физиологические и структурные различия, связанные со специализацией. В организме эти процессы происходят в онтогенезе от образования зиготы до естественной смерти. В культуре *in vitro* морфогенез имеет свою специфику. Эта специфика связана в первую очередь с вычленением экспланта и выходом его из-под контроля всего организма. Включается программа развития, приводящая к регенерации из группы клеток и тканей целого растения. Возможны и другие пути морфогенеза *in vitro* (образование корней – ризогенез, цветочных почек – флорогенез, каллуса – каллусогенез).

Регенерация растений зависит от ряда факторов, главными среди которых являются генетические особенности вида, физиологическое состояние растения и тип экспланта, химические и физические условия культивирования.

Одним из важнейших факторов является генотип растения. Существуют большие различия в морфогенетическом потенциале растений, то есть их способности регенерировать *in vitro*. Известно, что двудольные растения регенерируют лучше однодольных. Однолетние растения обычно регенерируют лучше

многолетних. Среди двудольных растений представители отдельных семейств (*Solanaceae*, *Begoniaceae*, *Cruciferae* и др.) регенерируют лучше других. Имеются различия между видами в пределах семейств, а также между сортами в пределах видов культурных растений [1, 3]. Эту генетическую специфику в способности к регенерации растений необходимо учитывать при разработке технологии клеточной инженерии, в особенности при клональном микроразмножении растений.

В ряде работ установлены тип наследования и локализация генов, ответственных за регенерацию генов *in vitro*, что позволяет использовать отдельные генотипы с высоким морфогенетическим потенциалом как доноры этого признака в селекции [3].

Процесс регенерации в культуре *in vitro* может протекать по двум направлениям: органогенез и соматический эмбриогенез [3].

1. Органогенез – образование монополярной структуры, т. е. отдельных органов из меристем (корней, стеблей, реже цветков или листьев). Формирование придаточных побегов *in vitro* в результате органогенеза происходит чаще и лучше поддается контролю, чем развитие соматических зародышей из культивируемых эксплантов. Существуют три способа получения растений через органогенез: путем формирования придаточных органов на каллусе, полученном из экспланта; путем формирования придаточных органов прямо из экспланта, минуя фазу каллусообразования; путем формирования растений-регенерантов из побегов, образовавшихся из верхушечных или пазушных почек.

2. Соматический или неполовой эмбриогенез – образование биполярных зародышеподобных структур из соматических клеток. Такие зародыши в дальнейшем развиваются в регенеранты через стадии аналогично зиготе.

Образование соматических зародышей в культуре *in vitro* может проходить прямым или косвенным путем. В первом случае эмбрионид образуется из клеток экспланта, минуя стадию каллуса. Такое явление характерно для цитрусовых культур.

Соматический эмбриогенез можно использовать для получения искусственных семян, а также клонального микроразмножения растений. Регенерация растений одним из описанных выше методов является главным звеном любой методики или технологии клеточной инженерии. Без успешной регенерации невозможны эксперименты по соматической гибридизации, гаплоидии, клеточной селекции, а также разработка промышленных методов клонального микроразмножения растений. Важную роль этот процесс играет и при создании трансгенных растений.

1.2. Использование гаплоидии в селекции растений

Важным методом хромосомной инженерии, повышающим эффективность селекции растений, является гаплоидия – получение особей с одинарным набором хромосом. В природе гаплоиды могут возникать спонтанно с частотой один гаплоид на 10^5 – 10^6 растений. Гаплоидные растения отличаются меньшей высотой стебля, позднеспелостью и, как правило, стерильностью. Для восстановления

исходного набора хромосом гаплоиды обрабатывают колхицином, что позволяет получить фертильные растения, полностью гомозиготные по всем аллельным генам. Возможно и спонтанное восстановление уровня пloidности.

Применение гаплоидов в селекции растений позволяет решить следующие задачи:

осуществить быстрое получение константного нерасщепляющегося материала после гибридизации (в F_2), гомозиготного по всем аллельным генам. В этом случае длительность селекционного процесса у самоопылителей сокращается на 3–4 года. Весьма перспективен такой подход для гетерозисной селекции, где создание инкухт-линий растянуто во времени на 5–6 лет.

провести эффективный отбор генотипов, так как у гаплоидов отсутствует явление доминирования, и все гены фенотипически проявляются. Идет элиминация организмов, несущих летальные и полулетальные гены. Эффективен отбор аддитивных и эпистатических эффектов.

получить моносомные линии для их использования в генетическом анализе и хромосомной инженерии.

В процессе создания гаплоидов широко используются методы *in vitro*. При этом возможны три подхода [7]:

1. Андрогенез – развитие гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных пыльников или микроспор, который применяется более чем для 250 видов растений, в том числе для таких хозяйственно ценных культур, как пшеница, рис, кукуруза, ячмень, лен, люцерна, виноград, яблоня и др.

2. Гиногенез – развитие гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных семязачек, который получил меньшее распространение по сравнению с андрогенезом, однако применяется при создании гаплоидов у сахарной свеклы, подсолнечника, картофеля, риса, пшеницы, кукурузы, ячменя, хлопчатника и др.

3. Партеногенез – развитие гаплоидов из гибридного зародыша, у которого из-за несовместимости хромосом родителей потеряны отцовские хромосомы (метод гаплопродюсеров). Наиболее успешно этот метод применяется у ячменя, где в качестве гаплопродюсера используют вид *Hordeum bulbosum*. Для получения гаплоидов у пшеницы и овса в качестве гаплопродюсера используют кукурузу.

Регенеранты, полученные одним из описанных выше методов, различаются по генотипу (гаметоклональная изменчивость). Эта изменчивость может быть усилена при использовании для получения гаплоидов не константного материала, а гибридов F_1 . Образующиеся гаметы у гибридов F_1 в результате рекомбинации будут нести различные комбинации генов родителей. Перевод полученных гаплоидов на диплоидный уровень позволит быстро использовать широкий спектр изменчивости у константных гаплоидов. Получение дигаплоидов от гаплоидов возможно спонтанно или путем применения колхицина.

Гаплоиды, полученные *in vitro*, находят все большее применение в селекционной практике. Так, китайские селекционеры за короткий срок создали с применением культуры пыльников новые высокоурожайные сорта риса и пшеницы,

в США получены двойные межлинейные гибриды кукурузы. Гаплоидию можно применять в селекции на гетерозис картофеля, люцерны, сорго, сахарной свеклы, рапса, подсолнечника, капусты, пшеницы, тритикале и других культур. В СНГ на основе гаплопродюсеров созданы два сорта ячменя – Исток и Одесский 115 (Селекционно-генетический институт, Одесса). Ведутся интенсивные работы по получению гаплоидов у пшеницы (Саратовский государственный университет), кукурузы (Саратовский государственный университет, Институт генетики АН Молдовы).

В Беларуси исследования по гаплоидам проводятся в Институте генетики и цитологии (тритикале, секалотритикум, пшеница, лен, картофель, сахарная свекла), НПЦ по земледелию (рапс, ячмень).

1.3. Клеточная селекция растений

Культивирование растительных клеток в культуре *in vitro* приводит, как правило, к накоплению генетической изменчивости. Полученные от этих клеток растения-регенеранты отличаются от исходных растений. Австралийские ученые Ларкин и Скоукрофт (цит. по [5]) предложили термин «сомаклоны» для растений, прошедших стадию неорганизованного роста *in vitro*. Само явление возникновения новых форм растений в результате накопления генетической изменчивости в растительных клетках, культивированных *in vitro*, называется соматической изменчивостью.

Для обозначения растений-регенерантов и их потомков приняты следующие термины: R – растение-регенерант; R₁, R₂ и т. д. – первое, второе и последующие самоопыленные поколения растения-регенеранта; SC – соматоклон; SC₁, SC₂ и т. д. – первое, второе и последующие самоопыленные поколения соматоклона.

Изменчивость, проявляющуюся у растений, регенерировавших в результате культивирования протопластов, называют протоклональной изменчивостью, регенерировавшие растения – протоклонами [4, 5].

Причинами проявления соматической изменчивости могут быть:

1. Наличие генетической изменчивости в соматической ткани, используемой в качестве экспланта для введения в культуру *in vitro*.
2. Переход растительных клеток в виде каллуса, суспензии или протопластов в недифференцированное состояние.
3. Длительное выращивание в культуре *in vitro*.
4. Использование специфических компонентов среды или фитогормонов.

Соматическая изменчивость может проявляться в следующих формах:

1. Цитогенетическая изменчивость (полиплоидия, анеуплодия, транслокации, делеции, инверсии, дупликации).
2. Генетическая изменчивость, связанная с мутациями генов ядра и цитоплазмы, транспозонами, амплификацией и редукцией генов, активацией ранее репрессированных генов, соматическим кроссинговером.
3. Негенетическая изменчивость (элиминация вируса, эпигенетические изменения).

На проявление соматклональной изменчивости сильно влияют генотип, орган растения, используемый в качестве экспланта, условия культивирования и регенерации растений.

В соматических тканях растений проявляется естественное генетическое разнообразие. Установлено, что в меристемных тканях в ходе дифференцировки почти у 80% покрытосеменных на различных этапах онтогенеза может происходить эндоредупликация хромосом и формирование тканей различного уровня пloidности. Возможно также образование клеток с анеупloidным числом хромосом. В результате образуются миксопloidы (организмы-химеры), ткани различаются по набору хромосом в геноме. Особенно часто накопление таких соматических мутаций наблюдается у вегетативно размножаемых растений (картофель, плодовые и др.). Естественный соматический мутагенез и миксопloidия как его результат могут быть усилены при культивировании организма в стрессовых условиях (повышенная или пониженная температура, засоление, и др.). Такие условия могут вызывать нарушения в митозе и привести к изменению числа хромосом. Таким образом, культивирование соматических миксопloidных тканей растений является потенциальным источником генетической изменчивости и представляет интерес для селекции.

Помещение соматических клеток в культуру *in vitro* усиливает частоту и спектр генетической изменчивости. При этом ткань экспланта выходит из-под контроля организма, что приводит к изменению гормонального баланса. Экзогенные гормоны, содержащиеся в среде, могут вызывать нарушения клеточного цикла. В целом для ткани культивирование *in vitro* может рассматриваться как стресс (увеличение раневой поверхности, изменение гормонального баланса и др.), в результате которого усиливается генетическая и эпигенетическая изменчивость в клетках соматических тканей (поли- и анеупloidия, точковые мутации, передвижение мобильных элементов, соматический кроссинговер, амплификации и др.). При генетической изменчивости образуется миксопloid, эпигенетическая изменчивость не наследуется. Наиболее часто генетическая изменчивость в культуре *in vitro* наблюдается у протопластов, поскольку одиночные клетки сильнее подвержены стрессовым условиям.

Длительность культивирования *in vitro* также увеличивает частоту возникновения мутаций в соматических тканях. Генетические изменения могут происходить не только в ядре, но и в цитоплазме (митохондрии, пластиды). Так, при культивировании каллусной ткани, полученной из незрелых зародышей кукурузы с тeхасским типом цитоплазмы (мужскостерильной), обнаружены мужски-фертильные регенеранты, причем признак наследовался по материнской линии. Анализ регенерантов на молекулярном уровне выявил наследованные изменения в митохондриальной ДНК.

Выявлены также соматклональные мутации пластидного генома. Примером могут быть альбиносные мутации, вызванные хлорофиллдефектностью. Установлено, что причиной такого рода мутации могут быть делеции хлоропластной ДНК.

Клеточная селекция предполагает отбор естественных или индуцированных мутантов *in vitro* на клеточном уровне, регенерацию из них растений и иденти-

фикацию мутаций в R_0 -потомстве. Для отбора клеток с желательными признаками используют селективные среды, в основном обеспечивающие системы резистентности к стрессовым воздействиям. В. А. Сидоров [5] выделяет следующие приемы для отбора мутантных клеток:

1. Прямая (позитивная) селекция, при которой выживает определенный мутантный тип клеток.

2. Непрямая (негативная) селекция, основанная на избирательной гибели делющихся клеток дикого типа и выживании метаболически неактивных клеток, но требующая дополнительной идентификации у них мутационных изменений.

3. Тотальная селекция, при которой индивидуально тестируются все клеточные клоны.

4. Визуальная селекция и неселективный отбор, когда мутантная линия может быть идентифицирована среди всей популяции клеток визуально или при использовании биохимических маркеров.

Наиболее распространенной является прямая селекция, основанная на отборе клеток с желаемыми признаками на устойчивость к стрессовым воздействиям (патогены, гербициды, засоление, неоптимальная температура, высокие или низкие значения pH, тяжелые металлы и др.). Как правило, селективные агенты добавляют в состав питательной среды. Для выделения соматоклонов, устойчивых к патогенам, используют среду с токсином, выделяемым патогеном, или с культуральной жидкостью, в которой развивался патоген. Для создания устойчивых к засолению форм, в состав питательной среды добавляют соли NaCl , Na_2SO_4 .

Обязательное условие успешной клеточной селекции: признак растения, по которому ведется отбор, должен проявляться на клеточном уровне.

1.4. Соматическая гибридизация

Под соматической гибридизацией понимается гибридизация между протопластами, выделенными из соматических клеток растений. Обычно для соматической гибридизации используют протопласты, полученные из мезофильных клеток листа или каллусных тканей. Для обозначения соматического гибрида используют вместо формулы $A \times B$, принятой для записи половой гибридизации, формулы $A + B$ или $A (\times) B$. Для обозначения гибрида, несущего гены ядра только одного из родителей, наряду с цитоплазматическими (внеядерными) генами от обоих или только от другого родителя, используют термин «цитоплазматический гибрид» («цибрид»). Гибриды, несущие альтернативные цитоплазматические гены от обоих родителей, называют «цитоплазматическими гетерозиготами» («цитогетами»).

Первое слияние протопластов было получено Пауэром и др. в 1970 г. Соматическая гибридизация растений включает четыре отдельных этапа: а) выделение протопластов; б) слияние протопластов; в) отбор и регенерация растений; г) анализ растений-регенерантов.

Ю. Ю. Глеба, К. Н. Сытник [4] отмечают, что соматическая гибридизация открывает перед исследователем возможность:

скрещивать филогенетически отдаленные виды растений (организмов), которые невозможно скрестить половым путем;

получить асимметричные гибриды, несущие весь генный набор одного из родителей наряду с несколькими хромосомами (или несколькими генами, или только органеллами и цитоплазмой) другого;

создать систему гибридизации, включающую одновременное слияние трех и более родительских клеток;

получить растения, гетерозиготные по внеядерным генам (генам пластид и митохондрий).

Принципиальные различия между половыми и соматическими гибридами заключаются в следующем. При половой гибридизации происходит слияние ядер материнского и отцовского организмов и цитоплазмы материнского организма. При соматической гибридизации возможно слияние как ядер, так и цитоплазм материнского и отцовского организмов. При этом имеет место совершенно иной тип наследования ядерных и цитоплазматических генов. Ядерные гены при соматической гибридизации наследуются как дву-, так однородительски, тогда как при половой – только двуродительски. Внеядерные гены при соматической гибридизации наследуются двуродительски, а при половой передаются обычно только по материнской линии.

В результате слияния протопластов можно получить после регенерации растения, создание которых невозможно половым путем:

1. Растения, ядро которых происходит от одного родителя, а цитоплазма – от другого (цибриды).
2. Растения, гетерозиготные по внеядерным генам (цитогеты).
3. Растения, часть внеядерных генов которых происходит от одного родителя, а часть – от другого.

1.5. Гаметная и зиготная селекция растений

Гаметофитный отбор в качестве метода селекции предложен недавно. Теоретически он был основан Д. Малкэхи в 1979 г. Автор высказал мысль, что отбор микрогаметофитов, устойчивых к какому-либо экстремальному фактору, может обеспечить появление спорофитов со сходной устойчивостью [8].

Важный вклад в развитие исследований по гаметной и зиготной селекции был внесен школой академика А. А. Жученко в Молдове (А. В. Кравченко, В. А. Лях, Н. Н. Балашова и др.). Отбор по гаметофиту не предполагает обязательного использования техники культивирования *in vitro*, хотя для оценки параметров пыльцы используют специальные среды. Однако учитывая, что отбор на уровне гаметофита происходит путем элиминации одной или группы клеток, его можно отнести к методам, весьма близким к клеточной селекции *in vitro* [9–11].

С чем связана потребность в методах гаметной селекции? Традиционным для селекционера является отбор на уровне спорофита. Между тем в онтогенезе растений на репродуктивных фазах развития происходит интенсивная элиминация нетрадиционных рекомбинантных генотипов, носящая характер стабилизи-

рующего отбора. До стадии взрослого растения доходит только очень малая часть генотипов. Согласно данным А. А. Жученко, А. Н. Кравченко [9–11], у некоторых межвидовых гибридов томата на стадиях гаметогенеза, сингамии, эмбриогенеза, формирования и прорастания семян гибнет свыше 90% рекомбинантных гамет и зигот. Этот процесс в большинстве случаев не контролируется селекционером и протекает в условиях культивирования генотипов F_1 .

На этапе развития споры и начала формирования гаметофита (особенно мужского) элиминируется 30–40% и более рекомбинантов. Значительная элиминация отмечается на этапах зрелой пыльцы, начала ее прорастания и роста пыльцевых трубок, оплодотворения, развития зародыша, формирования и прорастания семян. Полученный фактический материал свидетельствует, что селективная элиминация происходит на всех названных критических этапах, в первую очередь «нетрадиционных» рекомбинантов, что приводит к значительному сужению спектра генетической изменчивости и отбору рекомбинантов, лишь незначительно уклоняющихся от исходных генотипов (фиксируются адаптивные формы) в результате действия стабилизирующего естественного отбора.

В эволюционном плане гаплоидное поколение всегда подвергалось более жесткому отбору, чем диплоидное. Это привело к реакции «избегания» гаплоидного гаметофита из-под действия отбора за счет сокращения продолжительности гаплоидной фазы, упрощения строения гаметофита, перемещения его под защиту спорофитного организма.

Особое значение элиминация генотипов имеет при отдаленной гибридизации. Она сужает спектр доступной генетической изменчивости в селекционной практике, требует разработки принципиально новых методов и подходов, основанных на индуцировании генетической рекомбинации, сохранении рекомбинантных гамет и зигот, повышении эффективности отбора нужных генотипов в расщепляющихся популяциях.

Гаметная селекция имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционными методами отбора [11]:

1. Селекционер оперирует с пыльцой или женским гаметофитом, причем в первом случае число генотипов, подвергаемых отбору, исчисляется миллионами. В одной метелке кукурузы до 25 млн пыльцевых зерен.

2. Малый размер пыльцы позволяет выполнять отбор в лабораторных условиях, используя для этого регулируемые условия среды (фитотрон, теплица), анализировать небольшое количество растений.

3. Гаплоидный генотип гаметофита дает возможность обнаружить редкие рецессивные аллели, выявить сбалансированность генома.

4. Гаплоиды более уязвимы для действия факторов среды, что позволяет вести отбор на устойчивость к биотическим и абиотическим стрессам.

Гаметная селекция выполняется на уровне:

1. Мужских гаметофитов (этапы зрелой пыльцы, прорастания пыльцы и роста пыльцевых трубок).

2. Женских гаметофитов.

Наиболее часто используется отбор на уровне мужских гаметофитов.

Главное условие успешного отбора на уровне гаметофита – проявление генов, детерминирующих признак, на уровне гаметофита и спорофита. Рядом авторов при изучении ферментов гаметофита и спорофита показано, что приблизительно 60–70% структурных генов, экспрессирующихся в пыльце, проявляется также в спорофите. Это дает основание вести отбор спорофита по гаметофиту.

Зиготная селекция производится после образования зиготы на различных этапах ее развития вплоть до образования семян.

На ранних этапах онтогенеза возможно достижение двух основных целей селекционного процесса:

1. Расширение спектра генетической изменчивости в результате создания комфортных условий для прохождения развития от спорогенеза до образования семян. В этом случае смягчается действие естественного отбора в его стабилизирующей форме, и большее число редких рекомбинантов проходит через «сито» лимитирующих факторов среды. Среднее значение признака в популяции после такого отбора не изменяется (рис. 1.1).

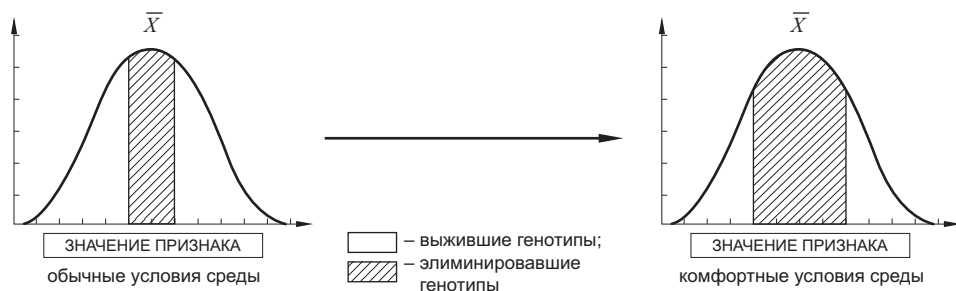


Рис. 1.1. Влияние комфортных условий среды в F_1 на расширение спектра рекомбинантов в F_2

2. Отбор устойчивых генотипов. Для этого направления гаметной и зиготной селекции ставится задача направить спектр изменчивости рекомбинантов в желаемое для селекционера русло путем создания стрессовых условий при развитии гамет и зигот (рис. 1.2). Среднее значение признака в популяции после такого движущего отбора изменяется. Отобранные генотипы более устойчивы к стрессовому фактору.

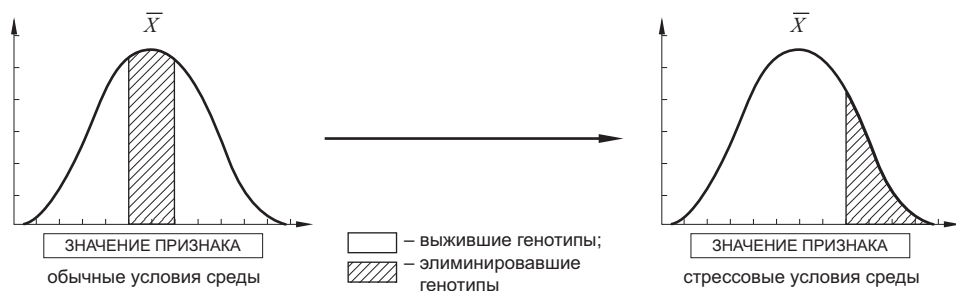


Рис. 1.2. Влияние стрессовых условий среды в F_1 на отбор устойчивых генотипов в F_2

Стресс может создаваться путем моделирования абиотических (неоптимальная температура, засоленность), биотических (токсины патогенов) и антропогенных (поллютанты) факторов среды. Таким образом, принципиальное отличие методов гаметной и зиготной селекции растений от традиционных подходов в том, что объектом отбора является генотип на ранних стадиях развития, а его пригодность для целей селекции оценивается по реакции на условия среды. В результате можно сохранить уникальные рекомбинанты, возникшие при отдаленной гибридизации, а также изменить генотипическую структуру популяции рекомбинантов в результате гибели неприспособленных генотипов. Несомненным преимуществом методов гаметной и зиготной селекции является их простота и доступность.

1.6. Клональное микроразмножение растений

Разработка методов культивирования *in vitro* различных видов растений создала предпосылки для применения принципиально новых подходов к их размножению. В настоящее время для ряда культур разработаны технологии клонального микроразмножения (синоним «микроразмножение»), т. е. способа вегетативного размножения растений на основе культуры *in vitro*. Такие технологии особенно актуальны для культур, размножаемых в производстве преимущественно вегетативно (картофель, плодовые, ягодные, декоративные, лесные растения). При длительном вегетативном размножении традиционными способами (черенки, луковички, усы и т. д.) дочерние растения накапливают вирусные, бактериальные и грибные инфекции, что снижает качество посадочного материала. Возникает необходимость в оздоровлении посадочного материала от инфекции.

Цели клонального микроразмножения [12]:

1. Ускоренное размножение уникальных генотипов в селекции растений.
2. Промышленное размножение посадочного материала высоких репродукций в семеноводстве растений.
3. Оздоровление посадочного материала от вирусной, бактериальной и грибной инфекции в процессе размножения.
4. Поддержание неконстантного материала, расщепляющегося в процессе семенного размножения (гибриды плодовых, ягодных, декоративных и других культур).
5. Размножение культур с длительным жизненным циклом (древесные растения).
6. Размножение растений, которые невозможно или трудно размножить *in vivo* (стерильные формы для гетерозисной селекции).

Преимущества клонального микроразмножения по сравнению с традиционными методами [3]:

1. Метод обеспечивает высокий коэффициент размножения, что дает возможность быстро внедрить в производство новые сорта растений. Метод не имеет альтернативы для видов, не размножаемых или трудно размножаемых *in vivo*.

2. В процессе размножения обеспечивается оздоровление посадочного материала путем применения методов апикальных меристем, термотерапии или химиотерапии.

3. Небольшое количество стартового материала, возможность его сохранения в генбанках, в том числе *in vitro*.

4. Выполнение работ в лабораторных условиях независимо от условий внешней среды, экономия площадей, возможность регуляции средовых факторов.

5. Возможность автоматизации выращивания *in vitro*, применения промышленных технологий получения посадочного материала.

Клональное микроразмножение целесообразно применять для получения высоких репродукций в семеноводстве с последующим применением традиционных методов вегетативного размножения оздоровленного посадочного материала.

В основе клонального микроразмножения лежит явление тотипотентности, то есть способности растения структурно и функционально восстанавливаться из части, органа или отдельной клетки. Такие активно делящиеся клетки расположены в недифференцированной ткани верхушечных (апикальных) меристем, а также меристем пазушных и спящих почек стебля и т. п.

Образование меристематических тканей может быть индуцировано в культуре *in vitro* из специализированных тканей. В этом случае возникают добавочные меристематические ткани (процесс дедифференциации) в виде точек роста или соматических эмбриоидов. В дальнейшем происходит регенерация из меристематических тканей по пути органогенеза или соматического эмбриогенеза. Добавочные меристемы формируются непосредственно в родительской ткани, из промежуточного каллуса или клеток суспензионных культур.

Существующие методы клонального микроразмножения можно классифицировать на три основных подхода в зависимости от типа меристематической ткани, используемой для регенерации, а также особенностей протекания процесса регенерации:

1. Активация развития уже существующих в растениях меристем (апекс стебля, пазушные и спящие почки стебля).

2. Индукция образования новых стеблевых почек или эмбриоидов непосредственно на тканях экспланта.

3. Возникновение почек или эмбриоидов из первичного и пересадочного каллуса, суспензионной культуры клеток или протопластов.

П. К. Деберг, А. Г. Мэйн (цит. по [1]) предложили выделить пять этапов (стадий) клонального микроразмножения:

Этап 0. Подготовительная стадия. На этой стадии растительный материал подготавливается к культуре *in vitro*. Цель этапа – получение стерильного стартового материала, находящегося в оптимальном для введения в культуру физиологическом состоянии.

Этап 1. Введение в культуру *in vitro*. Цель – обеспечение успешной пролиферации экспланта в культуре *in vitro*. Размножение на этом этапе не является важным.

Этап 2. Собственно размножение. Единственная функция этой стадии – увеличение числа побегов. Для этого индуцируются меристематические центры, которые развиваются в почки и/или побеги.

Этап 3. Удлинение побегов и укоренение. На этом этапе удлиняются побеги, индуцируются и развиваются корни.

Этап 4. Перенос в тепличные условия. Большинство видов требуют адаптации в условиях *ex vitro*.

Этапом и одной из целей клонального микроразмножения картофеля, плодовых, ягодных, декоративных, лесных растений является получение свободных от вирусов растений (*virus-free plants*).

Оздоровление посадочного материала от вирусной, бактериальной и грибной инфекций выполняется на основе одного из трех методов (метод апикальных меристем, метод термотерапии, метод химиотерапии) или их сочетания.

1.7. Растительно-микробные взаимодействия в селекции растений

Повышение потенциала растительно-микробных взаимодействий – одно из важнейших условий создания экологически сбалансированных систем растениеводства. Научной основой этого процесса является симбиогенетика – дисциплина, изучающая надорганизменные генетические системы, которые контролируют симбиотические отношения [13].

Растительно-микробный симбиоз является результатом длительной коэволюции генетических систем растения и бактерии. Наибольшая сопряженность этих систем наблюдается у бобовых растений с ризобиями. Однако есть основания считать, что другие растения, взаимодействующие с ассоциативной микрофлорой почвы, выработали в процессе эволюции генетические механизмы, обеспечивающие взаимодействие с бактериями. Основой для такого предположения служат результаты различной видовой и сортовой реакции культурных видов растений, взаимодействующих с микроорганизмами.

Возможным механизмом такой дифференциации генотипов является различный объем корневых выделений, специфика строения корневой системы и др., обеспечивающие наиболее эффективное взаимодействие генотипов растений и микроорганизмов.

Знания генетических механизмов взаимодействия растительно-микробных систем позволят выполнять направленную селекцию на повышение эффективности такого рода взаимодействий, комплементарности компонентов системы.

Такое направление исследований может рассматриваться как раздел биотехнологии растений, поскольку использует методы клеточной инженерии и направлено на повышение продуктивности и устойчивости растений.

Литература

1. Картель Н. А., Кильчевский А. В. Биотехнология в растениеводстве: учебник. – Минск, 2005. – 310 с.
2. Биотехнология. Кн. 3: Клеточная инженерия / Р. Г. Бутенко, М. В. Гусев, А. Ф. Киркин и др. – М., 1987. – 127 с.

3. *Основы сельскохозяйственной биотехнологии* / Г. С. Муромцев, Р. Г. Бутенко, Т. И. Тихоненко, М. И. Прокофьев. – М., 1990. – 384 с.
4. *Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Клеточная инженерия растений.* – Киев, 1984. – 159 с.
5. *Сидоров В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция.* – Киев, 1990. – 280 с.
6. *Картель Н. А. Биоинженерия: методы и возможности.* – Минск, 1989. – 143 с.
7. *Сельскохозяйственная биотехнология* / В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, Е. С. Воронин и др. – М., 2003. – 467 с.
8. *Mulcahy D. L. The rise of angiosperms: a genecological factor // Science.* – 1979. – N 206. – P. 20–23.
9. *Жученко А. А. Экологическая генетика культурных растений (адаптация, рекомбиногенез, агробиоценоз).* – Кишинев, 1980. – 586 с.
10. *Жученко А. А. Адаптивный потенциал культурных растений (Эколого-генетические основы).* – Кишинев, 1988. – 767 с.
11. *Методы гаметной селекции томатов* / А. Н. Кравченко, В. А. Лях, Л. Г. Тодераш и др. – Кишинев, 1988. – 152 с.
12. *Хасси Г. Размножение сельскохозяйственных культур in vitro // Биотехнология сельскохозяйственных растений.* – М., 1987. – С. 105–133.
13. *Тихонович И. А., Проворов Н. А. Симбиозы растений и микроорганизмов: молекулярная генетика агросистем будущего.* – Спб., 2009. – 210 с.

Глава 2

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МОРФОГЕНЕЗА РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

2.1. Томат (*Lycopersicon esculentum*)

Процессы каллусогенеза и регенерации как генетические признаки изучены на многих растительных объектах. В ряде работ авторы дают оценку генетическим эффектам культивирования *in vitro* клеток и тканей различных видов растений, подчеркивая, что морфогенетический потенциал растительной клетки проявляется в более широком диапазоне в системах *in vitro*, чем в природных условиях [1, 2, 3]. И. О. Андреев и соавт., оценивая генетические эффекты культивирования *in vitro* клеток и тканей, установили, что уже на ранних этапах происходят перестройки генома, проявляющиеся в полиморфизме продуктов RAPD-ПЦР. Часть обнаруженных изменений имела обратимый характер, что указывает на их взаимосвязь с процессами дедифференцировки клеток при индукции каллусообразования. Культивирование *in vitro* может вызывать дестабилизацию генома [4].

Рядом исследователей установлено, что процессы каллусообразования и регенерации растений видо- и сортоспецифичны. Значит, существуют виды, сорта с высоким и низким морфогенетическим потенциалом в изолированной культуре. Следовательно, актуальным становится выявление генотипов с высокой способностью к каллусогенезу и регенерации. Отбор таких генотипов в процессе селекции *in vitro* способствовал бы повышению результативности клеточных технологий [5–8]. В связи с этим процессы каллусообразования и регенерации растений *in vitro* в настоящее время стали предметом генетического анализа [9–13].

Для отбора генотипов искусственно созданные условия *in vitro* являются совершенно уникальными, так как в них реализуются генетические потенции клетки и ткани, но не целого растения. Общий принцип отбора растительных клеток в культуре *in vitro* заключается в том, чтобы признак растения, по которому ведется отбор, проявлялся на клеточном уровне (устойчивость к пониженным температурам, засухе, гербицидам, засолению и др.). Однако число изучаемых признаков растения в культуре *in vitro* весьма ограничено, а среда для изучения уникальна по сравнению с условиями *in vivo*. В связи с этим возникает вопрос о ценности информации о лучших генотипах, полученных в культуре *in vitro* и соответствии ее информации о генотипах *in vivo* [14]. Н. Д. Папазян в течение нескольких лет исследовал две линии кукурузы по признаку «способность к регенерации» и одновременно *in vivo* у этих же линий изучал изменчивость некоторых количественных признаков. Автором выявлено, что в результате отбора на клеточном уровне генотипов по признаку регенерации на организмен-

ном уровне обнаруживаются более пластичные формы, и таким образом усиливается модификационная изменчивость исходной популяции растений [15].

Большой интерес представляет вопрос о взаимосвязи между проявлением признаков *in vitro* и *in vivo*. Если такая связь существует, значит, есть основание предположить, что при селекции *in vitro* можно отобрать формы, обладающие достаточно высокими значениями хозяйственно ценных признаков. Кроме того, важно оценить типичность среды *in vitro* по отношению к условиям *in vivo*, а также выявить адаптивную способность генотипов в культуре *in vitro*. Все эти вопросы требуют постановки тщательных методических экспериментов на модельных объектах. Таким удобным модельным объектом является культура томата, имеющая большое народнохозяйственное значение, хорошо изученная в генетическом плане и достаточно успешно культивируемая *in vitro*. В связи с этим проведенный нами анализ наследования количественных признаков томата в условиях *in vitro* и *in vivo*, а также выявление особенностей взаимодействия генотипа и среды в культуре *in vitro* имеют очень важное теоретическое и практическое значение.

Исходным материалом для проведения исследований генетики каллусогенеза и регенерации растений у томата в условиях *in vitro* служили 8 родительских форм и 28 гибридов F_1 , полученных в результате диаллельных скрещиваний.

Асептические приемы в изолированной культуре осуществлялись общепринятыми методами для культуры *in vitro* [16–20].

В качестве эксплантов применялись сегменты семядолей, полученные от растений томата в фазе начала образования первого листа в стерильных условиях *in vitro*.

Изучались следующие признаки: «масса каллуса» (мг), «индекс роста» (отношение массы каллуса в конце пассажа к массе первоначального экспланта), «регенерационная способность» (отношение числа эксплантов, образовавших растения-регенеранты, к общему числу эксплантов, выраженное в процентах) и «количество побегов на эксплант» (шт.).

Генетику каллусообразования и регенерации оценивали при различных сочетаниях и концентрациях регуляторов роста в составе питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) [21]. Кроме того, применялись разные температурные режимы для каллусогенеза и уровни освещенности для получения растений-регенерантов.

Типичность условий *in vitro* по отношению к условиям *in vivo* изучали, используя массу каллуса 8 родительских форм томата, полученную на 12 вариантах питательной среды МС, содержащей различные концентрации 6-бензиламинопурина (6-БАП) и нафтилуксусной кислоты (НУК).

Учет результатов проводили на 30-й день культивирования эксплантов.

Для оценки генетических параметров признаков томата, определяемых в культуре *in vitro* и *in vivo*, применялась методика В. И. Наумана [22], комбинационная способность исходных образцов определялась по методу В. Griffing [23], параметры адаптивной способности и экологической стабильности генотипов, среды как фона для отбора – по методике А. В. Кильчевского, Л. В. Хотылевой [24, 25].

Внешний вид процессов каллусообразования и регенерации у томата представлен на рис. 2.1 и 2.2.

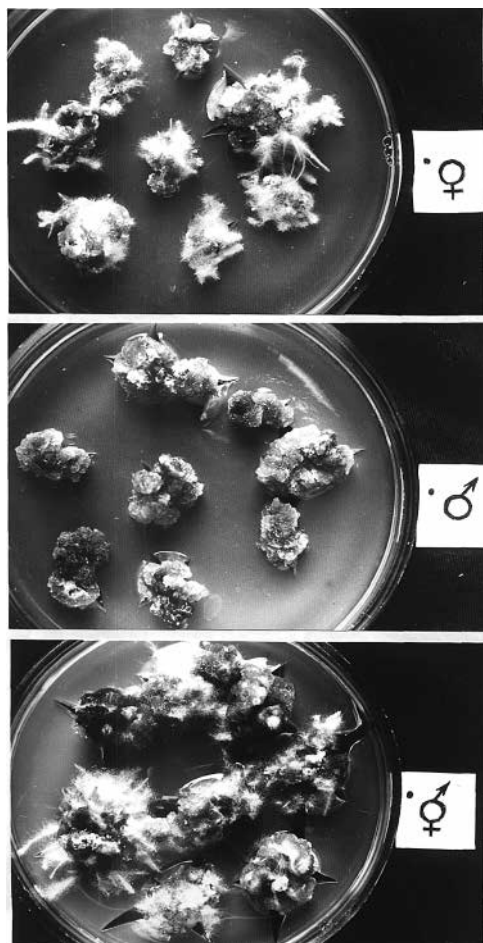


Рис. 2.1. Каллусогенез у томата на питательной среде 6-БАП и ИУК при t 24–26 °С (♀ – Линия 7, ♂ – Torosa, ♀ + ♂ – Линия 7 × Torosa)

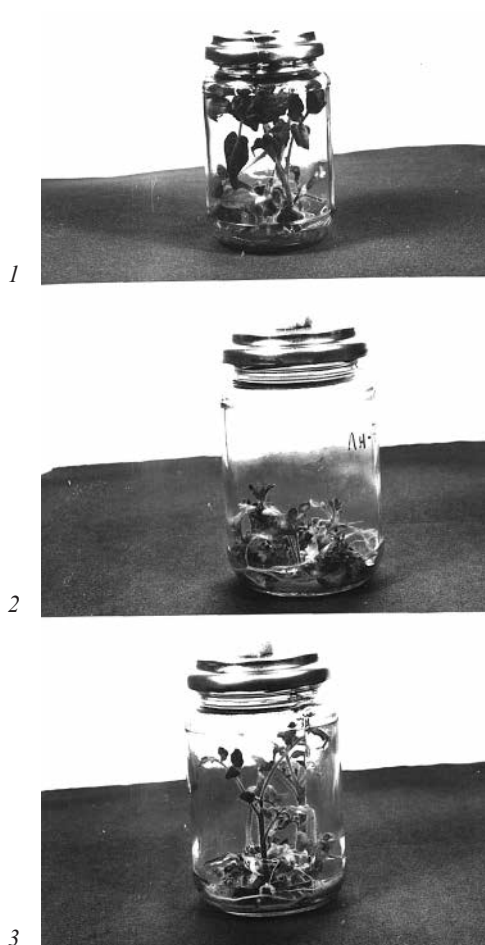


Рис. 2.2. Сортовая реакция процесса регенерации на питательной среде с ИУК и 6-БАП при освещенности 5–6 тыс. люкс: 1 – Талалихин; 2 – Линия 7; 3 – Torosa

2.1.1. Наследование признаков каллусогенеза у томата в культуре *in vitro*

Дисперсионный анализ комбинационной способности генотипов по признакам «масса каллуса» и «индекс роста» показал высокую достоверность различий по эффектам общей комбинационной способности (ОКС) и специфической комбинационной способности (СКС) (табл. 2.1). Соотношение средних квадратов ОКС/СКС по массе каллуса колебалось от 0,68 до 3,99; по признаку «индекс роста» – от 1,21 до 6,02, что свидетельствует о преобладании аддитивных эффектов над неаддитивными в различных условиях культивирования. Однако по

массе каллуса, полученной на среде, содержащей 6-БАП и НУК, при температуре 24–26 °С, эффекты доминирования и эпистаза, лежащие в основе СКС, проявлялись сильнее аддитивных эффектов. Заметно, что отношение средних квадратов ОКС/СКС при пониженной температуре по обоим признакам увеличивалось. Это говорит об усилении аддитивных эффектов.

Таблица 2.1. Дисперсионный анализ комбинационной способности образцов томата по признакам «масса каллуса» и «индекс роста» в различных условиях среды

Регуляторы роста	Условия культивирования	Средние квадраты		
		ОКС	СКС	ОКС/СКС
Масса каллуса, мг				
6-БАП, 2,4-Д	24–26 °С	45562,72*	22036,52*	2,07
6-БАП, 2,4-Д	11–13 °С	10977,73*	4684,44*	2,34
6-БАП, НУК	24–26 °С	20161,53*	29780,69*	0,68
6-БАП, НУК	11–13 °С	110934,23*	27780,82*	3,99
Индекс роста				
6-БАП, 2,4-Д	24–26 °С	57346,7*	30883,62*	1,86
6-БАП, 2,4-Д	11–13 °С	3178,46*	878,17*	3,62
6-БАП, НУК	24–26 °С	115308,79*	95040,88*	1,21
6-БАП, НУК	11–13 °С	38670,98*	6423,97*	6,02

* Существенно при $p = 0,01$.

Анализ параметров комбинационной способности генотипов томата по признаку «масса каллуса» в различных условиях культивирования (табл. 2.2) позволяет выделить по эффектам ОКС Доходный, Beta и Линию 7. Наименьшую массу каллуса на большинстве сред имела форма S. a. mini. Остальные генотипы меняли ранги в зависимости от температуры и гормонального состава питательной среды. Вариансы СКС были выше при использовании в составе питательной среды НУК. Наибольшими вариансами СКС обладали генотипы Доходный и Beta. Эти образцы могут быть использованы при гибридизации для повышения эффективности процесса каллусообразования у томата.

Таблица 2.2. Параметры комбинационной способности генотипов томата по признаку «масса каллуса» (в мг) в различных условиях среды

Генотип	БАП, 2,4-Д				6-БАП, НУК			
	24–26 °С		11–13 °С		24–26 °С		11–13 °С	
	ОКС	СКС	ОКС	СКС	ОКС	СКС	ОКС	СКС
Талахихин	–10,6	16427,6	–23,8	5043,9	2,0	30889,9	–130,4	19307,2
Доходный	86,2	32141,8	6,4	2843,5	–8,1	31871,8	87,3	26887,8
П-7	–72,1	26484,8	22,4	2529,1	–39,8	6936,8	–3,9	12081,2
Beta	47,3	26370,8	50,7	4719,9	47,2	15672,3	59,8	22323,0
S. a. mini	–115,2	9999,9	–54,9	3076,9	–87,8	56514,6	–89,6	14031,6
Линия 7	–13,6	9547,4	21,3	6113,4	31,7	14385,9	186,5	38274,2
<i>L. pimpinellifolium</i>	24,6	22823,3	–23,0	3851,9	29,1	6119,2	–72,3	23784,1
Torosa	53,4	16560,6	0,78	4516,2	25,8	13773,9	–37,3	44277,4
НСР ₀₅	37,4	–	14,6	–	76,2	–	32,3	–

Примечание. ОКС – константа ОКС; СКС – варианса СКС.

Вторым не менее информативным признаком каллусогенеза является индекс роста. Анализируя параметры комбинационной способности генотипов томата по этому признаку в различных условиях культивирования, можно выделить по эффекту ОКС сорт Доходный. По вариансам СКС лучшими были образцы Того-*sa*, *L. pimpinellifolium*. Самые низкие значения индекса роста каллуса на всех средах имел сорт Талалихин (табл. 2.3).

Следует также отметить, что изучаемые признаки каллусогенеза имели высокие значения на питательной среде, содержащей 6-БАП и НУК. Причем эта закономерность сохранялась как при оптимальной температуре, так и при пониженной. Однако масса каллуса и индекс роста эксплантов, культивируемых при температуре 11–13 °С на обеих используемых питательных средах, значительно уступают массе каллуса и индексу роста, полученным на этих же средах при температуре 24–26 °С. Таким образом, проявление признаков каллусообразования в значительной степени зависит от гормонального состава питательной среды и условий культивирования.

Таблица 2.3. Параметры комбинационной способности генотипов томата по признаку «индекс роста» в различных условиях среды

Генотип	БАП, 2,4-Д				6-БАП, НУК			
	24–26 °С		11–13 °С		24–26 °С		11–13 °С	
	ОКС	СКС	ОКС	СКС	ОКС	СКС	ОКС	СКС
Талалихин	–108,7	7719,1	–29,4	876,0	–162,1	12655,7	–93,1	3202,2
Доходный	97,2	7406,1	25,5	780,7	72,7	24627,1	82,2	10329,9
П-7	–81,3	13904,5	2,9	443,0	–118,8	16838,8	–15,2	4642,2
Beta	–45,7	9208,0	12,0	736,5	–53,2	19601,9	–0,3	6559,3
S. a. mini	–3,9	20548,0	–20,0	506,3	–14,2	21248,4	–24,1	4571,8
Линия-7	–0,3	10012,5	11,9	460,3	24,9	15521,9	98,3	4974,8
<i>L. pimpinellifolium</i>	68,2	74306,2	–4,1	1010,4	121,3	277372,7	–26,9	4527,3
Torosa	74,4	82366,5	1,2	810,9	129,2	311259,3	–20,9	8720,0
HCP ₀₅	27,3	–	5,7	–	36,2	–	19,4	–

П р и м е ч а н и е. ОКС – константа ОКС; СКС – варианта СКС.

Проведенные нами опыты по изучению влияния температуры и регуляторов роста на каллусогенез у сортов и гибридов томата показали, что характер наследования признаков зависит как от комбинации скрещивания, так и от условий культивирования (табл. 2.4). Сопоставление общего числа гибридов, проявивших гетерозис, с числом гибридов, где выявлен эпистаз, позволяет выделить гибриды, где гетерозис обусловлен доминированием и сверхдоминированием.

Характерно, что под действием различных ауксинов происходит изменение направления доминирования по массе каллуса у многих гибридов. При наличии в составе питательной среды НУК большая часть гибридов (46,4–64,3%) проявляют положительное сверхдоминирование, а при действии 2,4-Д у основного числа гибридов выявлено отрицательное сверхдоминирование (39,3–46,4%). На среде с 6-БАП и 2,4-Д при оптимальной температуре и на среде с 6-БАП, НУК при пониженной температуре проявляется эпистатическое взаимодействие генов.

Таблица 2.4. Степень доминирования по признакам «масса каллуса» и «индекс роста»

Условия культивирования	Регуляторы роста	Гибриды	Нр >1	-1 < Нр < 1	Нр < -1
Масса каллуса, мг					
24–26 °С	6-БАП, 2,4-Д	шт.	8 (0)	9 (0)	11 (4)
		%	28,6 (0)	32,1 (21,4)	39,3 (14,3)
	6-БАП, НУК	шт.	18	7	3
		%	64,3	25,0	10,7
11–13 °С	6-БАП, 2,4-Д	шт.	3	12	13
		%	10,7	42,9	46,4
	6-БАП, НУК	шт.	13 (6)	7 (5)	8 (4)
		%	46,4 (21,4)	25,0 (17,8)	28,6 (14,3)
Индекс роста					
24–26 °С	6-БАП, 2,4-Д	шт.	7 (2)	9 (5)	12 (3)
		%	25,0 (7,1)	32,1 (17,9)	42,9 (10,7)
	6-БАП, НУК	шт.	7 (1)	11 (7)	10 (2)
		%	25,0 (3,6)	39,3 (25,0)	35,7 (7,1)
11–13 °С	6-БАП, 2,4-Д	шт.	3	11	14
		%	10,7	39,3	50,0
	6-БАП, НУК	шт.	7	12	9
		%	25,0	42,9	32,1

Примечание. В скобках указано число гибридов, соответствующих ограничениям Хеймана.

Направление доминирования большинства гибридов по признаку «индекс роста» практически не изменяется при наличии различных ауксинов в составе питательной среды. Так, под действием 2,4-Д чаще проявлялось отрицательное сверхдоминирование (42,9–50,0%), положительное сверхдоминирование выявлено у 10,7–25,0% гибридов. В наследовании индекса роста на среде, содержащей НУК, преобладает промежуточное наследование (39,3–42,9% комбинаций).

Направление доминирования у гибридов сохранялось под действием различной температуры. Эпистатическое взаимодействие генов проявлялось на обеих питательных средах при оптимальной температуре. Таким образом, комбинационная способность генотипов томата в культуре *in vitro* по признакам каллусообразования изменяется в зависимости от условий культивирования.

Важно выявить связь между признаками каллусообразования. Нас заинтересовал факт изменения направления доминирования у ряда гибридов по массе каллуса и его сохранения по индексу роста. Если бы масса первичного эксплантата у всех генотипов была равной, между этими двумя признаками должна быть тесная положительная связь. Однако отсутствие такой связи очевидно. В связи с этим мы проанализировали массу семядоли перед посадкой у диаллельных гибридов томата. Выявлены существенные различия между сортами и гибридами по этому признаку. Анализ степени доминирования показал, что положительный гетерозис наблюдался в 14 случаях, отрицательный – только в трех, промежуточное наследование – в 11 случаях. Очевидно преобладание положительного гетерозиса по массе семядоли.

Таким образом, стартовые позиции генотипов перед помещением их в культуру *in vitro* были неравными. Так, например, масса семядоли у *S. a. mini* была более чем в 2 раза меньше, чем у Талахины. Генотипы с более крупными первичными эксплантами имели возможность при прочих равных условиях образовывать и больший каллус за равный отрезок времени. В связи с этим, на наш взгляд, при анализе генетики каллусообразования предпочтение следует отдавать признаку «индекс роста», отражающему динамику процесса каллусообразования, т. е. способность генотипа к образованию каллуса из экспланта независимо от его исходной массы. Признак «масса каллуса» является статическим показателем, отражающим процесс каллусообразования на определенном его этапе. Как известно, каллусогенез идет по сигмоидальной кривой, параметры которой зависят от генотипа. Анализ массы каллуса у генотипов на различных отрезках этой кривой, вероятнее всего, может дать разные результаты, так как процесс каллусогенеза у генотипов может происходить асинхронно из-за различной массы первичного экспланта и разных параметров сигмоидальной кривой.

Другой путь корректного анализа генетики массы каллуса – помещение в условия *in vitro* эксплантов равной массы.

Генетические параметры Хеймана по признаку «масса каллуса» представлены в табл. 2.5. Средняя степень доминирования по массе каллуса на среде с 2,4-Д при оптимальной температуре близка к единице (полное доминирование), а в остальных случаях колеблется от 1,65 до 1,81, что указывает на проявление сверхдоминирования. Произведение частот доминантных и рецессивных генов практически не изменяется по средам (0,19). Корреляция между значениями признака и суммой $Wr + Vr$ положительна на среде с 2,4Д при оптимальной температуре и отрицательна во всех остальных случаях. Изменение знака корреляции свидетельствует о смене характера доминирования. Соотношение доминантных и рецессивных генов говорит о преобладании доминантных аллелей на всех средах, за исключением среды с НУК при пониженной температуре. На среде с 2,4-Д при оптимальной температуре доминирует меньшая масса каллуса, в остальных случаях – большая. Подтверждением этому служит прогноз полностью доми-

Таблица 2.5. Параметры Хеймана по признакам «масса каллуса» и «индекс роста»

Условия культивирования	Регуляторы роста	$\sqrt{\frac{H_1}{D}}$	$\frac{H_2}{4H_1}$	$\frac{\sqrt{4DH_1 + F_1}}{\sqrt{4DH_1 - F}}$	r	D_{max}	R_{max}	$\frac{h^2}{H_2}$
<i>Масса каллуса, мг</i>								
24–26 °С	6-БАП, 2,4-Д	0,94	0,19	1,34	0,27	734,1	997,4	0,94
	6-БАП, НУК	1,77	0,19	2,67	–0,85	1443,4	646,9	0,88
11–13 °С	6-БАП, 2,4-Д	1,65	0,19	1,95	–0,56	355,6	30,8	0,31
	6-БАП, НУК	1,81	0,19	0,94	–0,94	557,2	155,4	0,15
<i>Индекс роста</i>								
24–26 °С	6-БАП, 2,4-Д	1,13	0,18	2,94	0,92	290,48	576,28	0,59
	6-БАП, НУК	1,08	0,17	2,81	0,08	524,17	588,41	0,05
11–13 °С	6-БАП, 2,4-Д	1,48	0,18	1,83	0,63	57,70	219,47	0,67
	6-БАП, НУК	1,52	0,21	0,95	0,18	147,02	241,88	0,0

нантного и полностью рецессивного родителя. Изучаемые генотипы отличаются по одной паре аллелей, хотя и не исключено действие генов-модификаторов.

Анализ генетической детерминации массы каллуса по графикам Хеймана (рис. 2.3) позволил установить, что характер наследования признака менялся от полного доминирования до сверхдоминирования в зависимости от состава питательной среды и условий культивирования (линия единичного наклона пересекает ось ординат вблизи от начала координат или на отрицательной ее части). Расположение генотипов на графиках дает возможность выявить проявление доминантных и рецессивных аллелей, действующих на признак. Анализ графиков позволяет установить, что под действием условий среды может происходить изменение проявления действия аллелей. При этом имеют место сложные взаимоотношения типа «ген × гормон × условия культивирования». Так, например, сорта Талалихин и П-7 на среде с 2,4-Д при оптимальной температуре и на среде с НУК при пониженной температуре попадают на участок графика с преобладающим действием рецессивных аллелей, а в остальных условиях среды в этих ге-

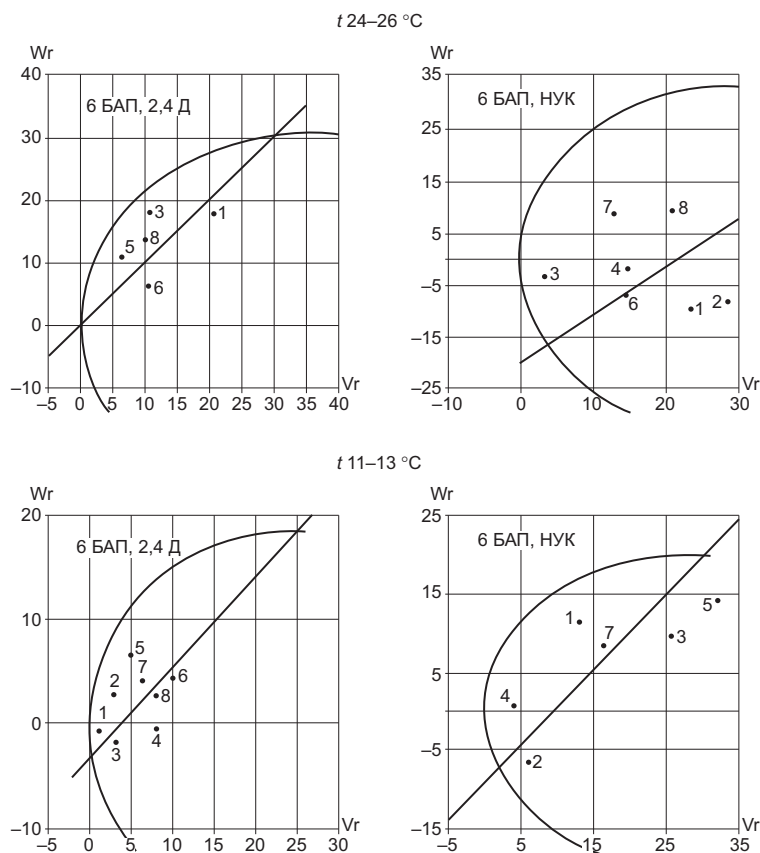


Рис. 2.3. Генетика признака «масса каллуса»

П р и м е ч а н и е. На рис. 2.3 и в последующих рисунках и таблицах раздела 2.1 принята следующая нумерация изучаемых образцов: 1 – Талалихин; 2 – Доходный; 3 – П-7; 4 – Beta; 5 – S. a. mini; 6 – Линия 7; 7 – *L. pimpinellifolium*, 8 – Torosa.

нотипах действуют доминантные аллели. Практически не происходит изменение проявления действия аллелей в различных условиях среды у сорта *Torosa*, который является носителем доминантных генов. У Линии 7 и *L. pimpinellifolium* под действием пониженной температуры усиливается проявление рецессивных аллелей. Аналогичная картина наблюдается у *S. a. mini* под действием смены ауксина (2,4-Д – НУК). На средах с 2,4-Д при оптимальной температуре и с НУК при пониженной температуре проявляется эпистаз, что приводит к потере отдельных линий на графике Хеймана.

Параметры Хеймана по признаку «индекс роста» свидетельствуют о проявлении сверхдоминирования во всех исследуемых средах, средняя степень доминирования колеблется от 1,08 до 1,52 (табл. 2.5). Произведение частот доминантных и рецессивных генов изменяется от 0,17 до 0,21. На всех средах, за исключением среды с НУК при пониженной температуре, преобладает действие доминантных генов. Коэффициент корреляции r , указывающий направление доминирования, изменяется от 0,08 до 0,92, при этом сохраняя знак. Положительная корреляция между суммой вариантов и коварианс и средним значением признака у родителей свидетельствует о том, что доминантные гены работают в сторону уменьшения значения признака. Это же подтверждается значениями полностью доминантного и полностью рецессивного родителя. Различия между генотипами обусловлены одним геном.

Графики Хеймана подтверждают выявленный характер наследования признака «индекс роста» по типу сверхдоминирования во всех исследуемых средах (рис. 2.4). Анализ графиков свидетельствует об изменении проявления действия аллелей в различных условиях. Так, сорт *Torosa* на среде с 2,4-Д при различной температуре расположен в нижней части графика, что указывает на действие доминантных аллелей, а на среде с НУК – в средней части графика, что указывает на равное действие доминантных и рецессивных аллелей. Не происходит изменение проявления действия аллелей в различных условиях среды у сорта Талалихин, который является носителем доминантных генов. У Линии 7 под действием пониженной температуры на среде с 2,4-Д усиливается проявление доминантных аллелей, а на среде с НУК при оптимальной и пониженной температуре сохраняется равное действие доминантных и рецессивных аллелей. Проявление эпистаза отмечено только в условиях оптимальной температуры.

Анализ параметров и графиков Хеймана по признакам каллусообразования существенно дополнил информацию, полученную при оценке комбинационной способности генотипов. В целом генетический анализ каллусогенеза свидетельствует о том, что признаки «масса каллуса» и «индекс роста» генетически детерминированы и зависят от условий культивирования. Основной формой проявления характера наследования массы каллуса в культуре *in vitro* является доминирование или сверхдоминирование, направление которого зависит от состава питательной среды и температурных условий. Не отмечено переопределения генетических формул индекса роста каллуса, поскольку знак коэффициента корреляции между суммой коварианс и вариантов и средним значением признака не изменялся в зависимости от различных условий. Наследование этого признака

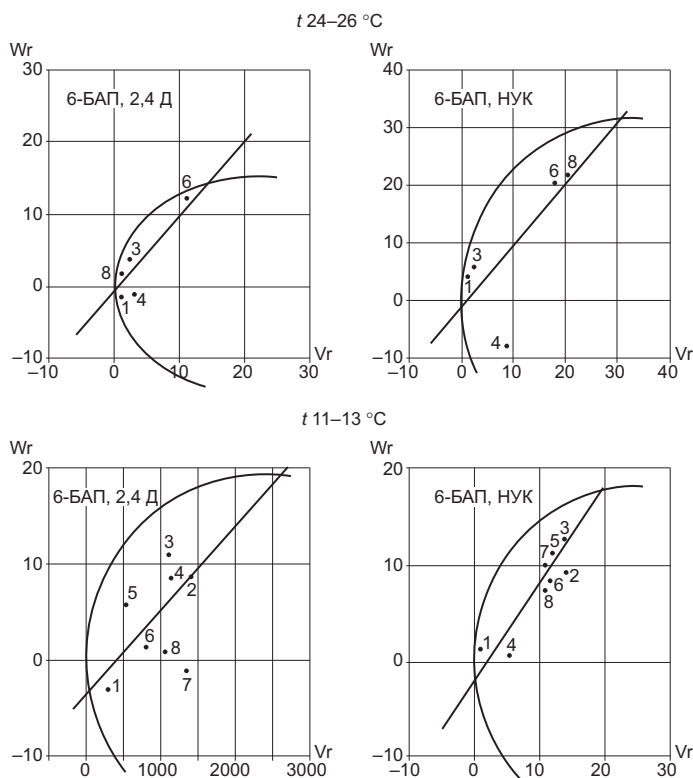


Рис. 2.4. Генетика признака «индекс роста»

осуществлялось по типу сверхдоминирования, причем, как правило, в сторону меньшего значения индекса роста.

В табл. 2.6 представлены усредненные по четырем средам данные по массе каллуса у восьми родителей и гибридов между ними. Наибольшая масса каллуса отмечена у образцов Талалихин, Линия 7, Beta, Torosa и Доходный. Самое слабое каллусообразование наблюдалось у формы S. a. mini. У гибридов чаще всего проявлялось положительное сверхдоминирование (13 гибридов), в 8 случаях отмечено промежуточное наследование, в 7 – отрицательное сверхдоминирование. Относительная стабильность генотипов (S_{gi}) является характеристикой изменчивости генотипа в различных условиях среды по изучаемому признаку (чем выше S_{gi} , тем менее стабилен генотип). Данные свидетельствуют, что по стабильности среди лучших форм выделились Доходный, Beta и Линия 7. В большинстве случаев (50%) имеет место положительное сверхдоминирование в сторону увеличения S_{gi} (уменьшения стабильности) и только у 4 гибридов – отрицательное сверхдоминирование. Все эти четыре комбинации проявляют гетерозис по массе каллуса.

По признаку «индекс роста» (табл. 2.7) в среднем по всем средам испытания выделяются следующие образцы: *L. pimpinellifolium* × Torosa, Доходный × Torosa, Доходный × Линия 7, Линия 7, Доходный × S. a. mini, S. a. mini × Torosa, Доходный.

Таблица 2.6. Среднее значение и относительная стабильность генотипов томата по признаку «масса каллуса» (в мг)

Номер генотипа	Номер генотипа							
	1	2	3	4	5	6	7	8
$\bar{x}_i$								
1	759,3	633,2	610,1	756,0	643,1	555,2	636,6	615,2
2		733,5	665,7	745,1	849,4	861,6	851,1	731,2
3			624,4	755,0	688,9	767,8	659,0	746,1
4				732,3	699,8	904,7	753,3	808,8
5					422,0	667,1	534,5	579,2
6						741,9	805,3	894,3
7							697,2	636,8
8								735,0
S_{gi}								
1	71,6	64,2	92,3	83,2	100,2	87,3	91,6	78,7
2		49,9	61,1	71,6	67,1	63,9	71,2	89,3
3			72,4	61,6	74,6	56,4	76,8	69,6
4				57,1	77,8	57,6	66,0	66,2
5					75,4	77,8	99,4	85,5
6						61,6	54,8	53,5
7							83,4	104,0
8								70,6

Таблица 2.7. Среднее значение и относительная стабильность генотипов томата по признаку «индекс роста»

Номер генотипа	Номер генотипа							
	1	2	3	4	5	6	7	8
$\bar{x}_i$								
1	225,9	211,6	217,8	227,7	189,6	222,3	256,7	221,4
2		429,6	375,4	421,3	458,1	478,2	386,8	486,6
3			282,2	290,4	220,5	332,1	193,4	257,4
4				334,1	224,4	289,2	278,9	364,0
5					359,8	355,3	197,4	462,1
6						466,7	364,8	344,0
7							385,7	929,8
8								188,4
S_{gi}								
1	71,4	64,1	91,9	83,0	100,1	87,3	91,6	78,6
2		50,1	44,0	85,6	59,6	63,9	71,2	89,3
3			72,3	61,5	76,2	56,4	76,6	69,5
4				57,1	77,7	57,5	65,9	66,1
5					75,6	77,9	99,4	90,4
6						61,6	54,9	53,5
7							83,5	103,6
8								70,9

Среди них к стабильным по S_{gi} можно отнести Доходный, Доходный $\times$ S. a. mini, Линия 7. Самым нестабильным оказался гибрид *L. pimpinellifolium* $\times$ Torosa.

Следует отметить, что среди лучших семи генотипов по массе каллуса и индексу роста только два общих: Доходный $\times$ S. a. mini и Доходный $\times$ Линия 7.

Поэтому генотип, лучший по массе каллуса, не обязательно является лучшим по индексу роста. Так, например, S. a. mini, худший среди всех генотипов по массе каллуса, в числе средних по индексу роста; а Torosa, худший среди всех по индексу роста, также в числе средних по массе каллуса. Можно предположить, что генетическая детерминация этих признаков отличается, о чем свидетельствует также и различный характер их наследования в зависимости от условий культивирования.

Для оценки среды как фона для отбора генотипов нами использовались следующие параметры: d_k – продуктивность фона; S_{ek} – относительная дифференцирующая способность; t_k – типичность; P_k – предсказующая способность (табл. 2.8). Как правило, при оценке фона *in vitro* обычно исходят из критерия оптимальности процесса, то есть наибольших значений признаков. На наш взгляд, такая установка не совсем обоснована и уместна лишь в тех случаях, если целью является не отбор, а культивирование генотипов *in vitro*. При клеточной селекции очень важны типичность и дифференцирующая способность среды (способность выявлять изменчивость). При определении типичности в условиях *in vitro* точкой отсчета будут средние значения признаков каллусообразования у всех изучаемых генотипов на всех средах. Анализируя параметры, мы понимаем под «средой» сочетание условий культивирования (температура) с составом питательных сред.

Таблица 2.8. Параметры среды как фона для отбора генотипов томата по признакам «масса каллуса» и «индекс роста»

Температура	Регуляторы роста	d_k	S_{ek}	t_k	P_k
<i>Масса каллуса, мг</i>					
24–26 °C	6-БАП, 2,4-Д	123,6	19,1	0,569	0,109
	6-БАП, НУК	643,2	12,0	0,707	0,085
11–13 °C	6-БАП, 2,4-Д	–495,3	31,5	0,616	0,194
	6-БАП, НУК	–271,5	47,5	0,750	0,356
<i>Индекс роста</i>					
24–26 °C	6-БАП, 2,4-Д	64,0	47,91	0,948	0,454
	6-БАП, НУК	303,5	49,51	0,955	0,473
11–13 °C	6-БАП, 2,4-Д	–236,0	34,12	0,574	0,196
	6-БАП, НУК	–131,6	56,17	0,486	0,273

Параметры фона по признаку «масса каллуса» позволяют выделить по продуктивности среду, содержащую 6-БАП и НУК при оптимальной температуре (эффект среды d_k у нее наибольший). Однако она имела среднюю типичность и отличалась наименьшей относительной дифференцирующей способностью и предсказующей способностью – интегральным показателем пригодности среды для отбора. По этим параметрам лучшими были условия культивирования при пониженной температуре, особенно на среде, содержащей НУК. Таким

образом, преимущества как фон для отбора генотипов *in vitro* имели низкопродуктивные среды.

Иная картина наблюдалась при оценке сред по признаку «индекс роста». Лучшей была среда, содержащая 6-БАП и НУК при оптимальной температуре. Эта же среда имела среднюю относительную дифференцирующую способность, наибольшую типичность и была наилучшей по предсказующей способности. Анализ параметров фона по признакам каллусообразования в культуре *in vitro* позволяет сделать вывод, что понятия «оптимальная среда для культивирования» и «оптимальная среда для отбора» не всегда совпадают. В последнем случае среда не обязательно отличается высокими значениями признаков генотипов в культуре *in vitro*. Успешный отбор может проводиться и на стрессовых средах при высокой дифференцирующей способности и типичности условий среды. Для каждого признака необходимо подбирать среду, обеспечивающую максимальную типичность и дифференциацию генотипов.

Таким образом, анализ каллусогенеза у томата показывает, что в генетической детерминации признаков «масса каллуса» и «индекс роста» преобладают аддитивные эффекты, комбинационная способность генотипов по обоим признакам зависит от условий культивирования, но по признаку «масса каллуса» взаимодействие «генотип × среда» проявляется сильнее, чем по признаку «индекс роста». Степень доминирования гибридов по массе каллуса сильнее изменяется в зависимости от гормонального состава питательной среды и в меньшей степени – от температуры. По признаку «индекс роста» не было отмечено сильных изменений степени доминирования в различных условиях культивирования. В наследовании обоих признаков проявляются эффекты сверхдоминирования. Лучшие гибриды по массе каллуса не обязательно являются лучшими по индексу роста, что свидетельствует о различной генетической детерминации этих признаков. Оптимальными для культивирования каллуса являются среда, содержащая 6-БАП и НУК, и температура 24–26 °С. Однако понятия «оптимальная среда для культивирования» и «оптимальная среда для отбора» по признаку «масса каллуса» не совпадают. Успешный отбор по этому признаку может проводиться и на стрессовых средах при их высокой дифференцирующей способности и типичности. При анализе генетики каллусогенеза предпочтительным является признак «индекс роста», отражающий динамику процесса каллусообразования, в меньшей степени подверженный взаимодействию «генотип × среда» и не зависящий от исходной массы экспланта.

2.1.2. Наследование признаков регенерации у томата в культуре *in vitro*

Важнейшим этапом ведения работ в культуре *in vitro* является регенерация как совокупность процессов, обеспечивающих восстановление целостности растения. Без успешной регенерации все работы в области генетической и клеточной инженерии не находят логического завершения. Отбор генотипов с высоким регенерационным потенциалом будет способствовать результативности клеточных технологий. В связи с этим целесообразно, применяя методы диаллельного

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие редакторов	5
Принятые сокращения	6
Глава 1. Клеточная инженерия в генетике, селекции и семеноводстве (А. В. Кильчевский)	8
1.1. Генетические основы морфогенеза <i>in vitro</i>	9
1.2. Использование гаплоидии в селекции растений	10
1.3. Клеточная селекция растений	12
1.4. Соматическая гибридизация	14
1.5. Гаметная и зиготная селекция растений	15
1.6. Клональное микроразмножение растений	18
1.7. Растительно-микробные взаимодействия в селекции растений	20
Литература	20
Глава 2. Генетические исследования морфогенеза растений в культуре <i>in vitro</i>	22
2.1. Томат (<i>Lycopersicon esculentum</i>) (А. В. Кильчевский, Т. В. Никонович)	22
2.1.1. Наследование признаков каллусогенеза у томата в культуре <i>in vitro</i>	24
2.1.2. Наследование признаков регенерации у томата в культуре <i>in vitro</i>	34
2.1.3. Связь между признаками томата в культуре <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	44
Литература	47
2.2. Ячмень (<i>Hordeum vulgare</i> L.) (Н. А. Картель)	48
2.2.1. Каллусообразование и органогенез у разных по генотипу растений ячменя	49
2.2.2. Каллусообразование и органогенез из двухнедельных триплоидных эмбрионов ячменя	55
2.2.3. Отбор соматклонов ячменя, устойчивых к корневой гнили	57
Литература	60
2.3. Лен (<i>Linum usitatissimum</i> L.) (О. А. Орловская, С. В. Кубрак, Е. Н. Гузенко, М. В. Шут, В. А. Лемеш, Л. В. Хотылева)	61
2.3.1. Использование гипокотильных сегментов льна в культуре <i>in vitro</i>	65
2.3.2. Сравнительная характеристика процессов каллусогенеза и морфогенеза гипокотильных эксплантов сортов льна-долгунца и льна масличного	77
2.3.3. Использование семядольных эксплантов льна-долгунца в культуре <i>in vitro</i>	80
2.3.4. Ризогенез в культуре <i>in vitro</i> у сортов льна-долгунца и льна масличного (<i>Linum usitatissimum</i> L.)	89
Литература	93

2.4. Тритикале ($\times$ <i>Triticosecale</i>) (Н. М. Ермишина, Е. М. Кременовская, О. И. Зайцева, И. А. Гордей)	97
2.4.1. Соматический морфогенез у тритикале	97
2.4.2. Андрогенез <i>in vitro</i> у тритикале	98
2.4.3. Стадия развития микроспоры	99
2.4.3.1. Динамика развития микроспор в культуре пыльников ярового тритикале в зависимости от предобработок колосьев	99
2.4.4. Условия выращивания растений – доноров пыльников	102
2.4.5. Фактор питательной среды	103
2.4.6. Влияние различных режимов предобработки колосьев растений-доноров на индукцию пыльцевого эмбриогенеза тритикале	104
2.4.7. Фактор генотипа донорного растения	106
2.4.8. Анализ комбинационной способности	108
Литература	112
Глава 3. Гаплоидия в генетике и селекции растений	116
3.1. Пшеница (<i>Triticum aestivum</i> L.) (П. А. Орлов, Г. В. Мозгова)	116
3.1.1. Отдаленная гибридизация	116
3.1.2. Культура пыльников	117
3.1.2.1. Влияние генотипа на способность к индукции эмбриогенеза и регенерации в культуре пыльников пшеницы	119
3.1.2.2. Воздействие предварительных обработок колосьев и пыльников, условий культивирования и состава питательных сред на эффективность индукции эмбриогенеза и регенерацию растений в культуре пыльников пшеницы	133
3.1.2.3. Исследование генетической однородности линий удвоенных гаплоидов пшеницы	138
3.1.2.4. Изучение продуктивности удвоенных гаплоидов пшеницы и гибридов с их участием	140
3.1.3. Культура изолированных микроспор	144
Литература	150
3.2. Тритикале ($\times$ <i>Triticosecale</i> L.) (Н. М. Ермишина, Е. М. Кременовская, О. И. Зайцева, В. А. Лемеш)	154
3.2.1. Анализ морфогенетических процессов в культуре пыльников <i>in vitro</i> дигаплоидных линий ярового тритикале	157
3.2.2. Анализ продуктивности и устойчивости удвоенных гаплоидов ярового тритикале ..	159
3.2.3. Создание форм с замещениями хромосом при помощи метода культуры пыльников. .	162
Литература	168
3.3. Картофель (<i>Solanum tuberosum</i> L.) (Е. В. Воронкова, А. П. Ермишин)	170
3.3.1. Использование гаплоидии в генетике и селекции картофеля	170
3.3.2. Методы гаплоидизации картофеля	172
3.3.2.1. Индукция гиногенеза	172
3.3.2.2. Андрогенез в культуре <i>in vitro</i> пыльников или пыльцы картофеля	179
3.3.3. Цитогенетическая нестабильность андрогенетических растений-регенерантов . .	191
3.3.4. Изменчивость растений-регенерантов, полученных в культуре пыльников картофеля из нередуцированных микроспор	195
Литература	199

3.4. Сахарная свекла (<i>Beta vulgaris</i> L.) (А. М. Свирицевская, Л. В. Милько, В. Е. Бормотов)	203
3.4.1. Гаплоидия у сахарной свеклы. Методы получения гаплоидов <i>in vivo</i>	204
3.4.2. Индукция гаплоидов свеклы в культуре <i>in vitro</i> . Технология экспериментального гиногенеза	205
3.4.3. Формирование удвоенных гаплоидов – уникального исходного материала для селекции. Возможности и перспективы использования гаплоидии у сахарной свеклы	207
3.4.4. Совершенствование технологии гиногенеза <i>in vitro</i> и создание нового линейного материала сахарной свеклы гиногенетического происхождения в Беларуси	209
Литература	214
Глава 4. Соматическая гибридизация и клеточная селекция картофеля (<i>Solanum tuberosum</i> L.) (Г. А. Яковлева).	217
4.1. Соматическая гибридизация	217
4.1.1. Выделение и культивирование протопластов картофеля с регенерацией растений	218
4.1.2. Слияние протопластов картофеля	222
4.1.3. Типы соматической гибридизации.	223
4.1.4. Идентификация соматических гибридов.	225
4.1.5. Примеры успешной межвидовой соматической гибридизации картофеля	228
4.1.6. Вариации цитоплазмона межвидовых соматических гибридов картофеля	237
4.2. Селекция <i>in vitro</i> картофеля.	239
Литература	244
Глава 5. Клональное микроразмножение растений	251
5.1. Картофель (<i>Solanum tuberosum</i> L.) (Г. А. Яковлева, Т. Г. Янчевская, А. В. Кильчевский, Л. Г. Коготько, Е. Л. Ионас)	251
5.1.1. Микрочеренкование растений картофеля в стерильной культуре <i>in vitro</i>	253
5.1.2. Микрочеренкование растений картофеля в нестерильной культуре <i>in/ex vitro</i>	259
5.1.2.1. Микроразмножение растений картофеля в пробирках в нестерильных условиях	259
5.1.2.2. Клональное микроразмножение в нестерильных условиях <i>ex vitro</i>	260
5.1.3. Получение первого клубневого поколения картофеля	265
5.1.3.1. Получение микроклубней картофеля <i>in vitro</i>	265
5.1.3.2. Биотехнологические приемы получения мини-клубней картофеля <i>ex vitro</i> и <i>in vivo</i> в пленочных теплицах.	265
5.1.4. Совершенствование технологии выращивания первой клубневой репродукции оздоровленного посадочного материала картофеля	268
5.1.5. Ионитопонная технология получения мини-клубней картофеля <i>in vivo</i>	276
5.1.6. Фенотипическая изменчивость картофеля при клональном микроразмножении.	280
5.1.7. Депонирование коллекции оздоровленных сортов картофеля <i>in vitro</i> в НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству	282
Литература	284
5.2. Плодовые и ягодные культуры (Н. В. Кухарчик, М. С. Кастрицкая, С. Э. Семенас, Е. В. Колбанова, Е. А. Красинская)	289
5.2.1. Вегетативное размножение плодовых и ягодных культур <i>in vitro</i>	289
5.2.1.1. Инициация культуры <i>in vitro</i> плодовых и ягодных культур	290
5.2.1.2. Микроразмножение плодовых и ягодных культур <i>in vitro</i>	297
5.2.1.3. Укоренение плодовых и ягодных культур <i>in vitro</i>	303
5.2.1.4. Адаптация регенерантов плодовых и ягодных культур <i>ex vitro</i>	307

5.2.2. Культура изолированных зародышей в селекции плодовых растений	316
5.2.2.1. Питательные среды	319
5.2.2.2. Период выделения зародышей	323
5.2.2.3. Стратификация зародышей	324
5.2.2.4. Проплиферация и укоренение гибридных эмбрионов	325
5.2.2.5. Адаптация <i>ex vitro</i> гибридных регенерантов	326
Литература	328
5.3. Брусника обыкновенная (<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.) (В. Н. Решетников, О. В. Чижик, В. Л. Филипеня, В. И. Горбачев)	334
5.3.1. Особенности регенерации <i>in vitro</i> брусники обыкновенной	334
5.3.2. Микрклональное размножение брусники обыкновенной	335
5.3.2.1. Инициация и стабилизация асептических культур интродуцированных сортов брусники обыкновенной	336
5.3.2.2. Оптимизация условий микроклонирования брусники обыкновенной	338
5.3.2.3. Укоренение брусники обыкновенной	339
5.3.3. Адвентивный морфогенез из соматических тканей интродуцированных сортов брусники обыкновенной	341
Литература	346
5.4. Голубика высокорослая (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) (В. Н. Решетников, А. В. Кильчевский, Ж. А. Рупасова, В. Л. Филипеня, О. В. Чижик, В. И. Горбачев, А. А. Иванович)	347
5.4.1. Микрклональное размножение голубики высокорослой	348
5.4.1.1. Инициация и стабилизация асептических культур интродуцированных сортов голубики высокорослой	349
5.4.1.2. Оптимизация условий размножения голубики высокорослой	351
5.4.1.3. Индукция адвентивного корнеобразования и адаптация <i>ex vitro</i>	352
Литература	354
5.5. Декоративные растения	355
5.5.1. Гиацинт восточный (<i>Hyacinthus orientalis</i> L.) (В. Н. Решетников, Е. А. Попович, В. Л. Филипеня, О. В. Чижик)	355
5.5.1.1. Влияние ауксинов на эффективность морфогенеза гиацинта восточного	356
5.5.1.2. Индукция морфогенеза под действием цитокининов	359
5.5.1.3. Влияние комбинаций ауксинов и БАП на регенерацию гиацинта восточного	361
5.5.1.4. Морфогенез гиацинта восточного в зависимости от физического состояния среды культивирования	363
Литература	364
5.5.2. Лилия (<i>Asiatic Lilies</i>) (А. В. Кильчевский, В. В. Французёнок)	365
5.5.2.1. Этап введения в стерильную культуру	365
5.5.2.2. Этап собственно микроразмножения	372
5.5.2.3. Адаптация регенерантов и доращивание микрорастений <i>in vivo</i>	374
Литература	376
Глава 6. Гаметная селекция растений	378
6.1. Томат (<i>Lycopersicon esculentum</i>) (А. В. Кильчевский, И. Г. Пугачева, М. М. Добродькин, Н. Ю. Лецина)	378
6.1.1. Разработка методики отбора холодостойкой пыльцы томата	379
6.1.2. Изучение возможности использования экзогенных и эндогенных факторов роста для стимуляции пыльцы томата, подвергшейся действию низкотемпературного стресса	383

6.1.3. Изучение корреляционных связей между признаками спорофита и гаметофита томата	384
6.1.4. Изучение влияния режимов обработки пыльцы на холодостойкость спорофита томата	389
6.1.5. Эффективность циклической селекции томата по гаметофиту и спорофиту на холодостойкость и продуктивность	391
6.1.6. Наследование холодостойкости гаметофита и спорофита у томата	396
Литература	399
6.2. Люпин (<i>Lupinus</i> L.) (В. С. Анохина, И. Б. Саук, М. К. Тимошенко, Е. А. Брыль, В. В. Дуксина)	402
6.2.1. Оценка генотипов люпина на устойчивость к грибным болезням	406
6.2.1.1. Устойчивость к фузариозу	406
6.2.1.2. Устойчивость к антракнозу	412
6.2.2. Оценка люпина по устойчивости к абиотическим стрессам	416
6.2.2.1. Устойчивость к температурному стрессу	416
6.2.2.2. Устойчивость к засолению	420
6.2.3. Сопряженность устойчивости к грибным болезням с биохимическими характеристиками растений люпина	423
Литература	430
Глава 7. Растительно-микробные взаимодействия в селекции томата (А. В. Кильчевский, О. Г. Бабак, Н. А. Некрашевич, А. А. Бажанова, Д. П. Бажанов)	434
7.1. Оценка отзывчивости образцов томата на обработку штаммами ризосферных бактерий <i>Herbaspirillum</i> sp. 416 и <i>Burkholderia</i> sp. 418	437
7.2. Наследование хозяйственно ценных признаков у гибридов томата F ₁ при взаимодействии со штаммом <i>Burkholderia</i> sp. 418	441
Литература	451
Глава 8. Биотехнология лесных культур (В. Е. Падутов, О. Ю. Баранов, Д. В. Кулагин) ...	454
8.1. Состояние и перспективы развития лесной биотехнологии	454
8.1.1. Использование биотехнологии в лесном хозяйстве	454
8.1.2. Методы, используемые в лесной биотехнологии	457
8.2. <i>In vitro</i> культуры лесных древесных пород	460
8.2.1. Особенности создания и поддержания культур лесных древесных растений <i>in vitro</i> ..	460
8.2.2. Начальные этапы получения асептических культур	462
8.2.3. Получение первичных асептических культур	465
8.2.4. Этап мультипликации	470
8.2.5. Холодовое хранение	471
8.2.6. Этап ризогенеза (укоренения)	472
8.3. Адаптация микроклональных растений	474
8.3.1. Влияние состава субстрата	474
8.3.2. Влияние схемы культивирования	475
8.3.3. Влияние удобрений	477
8.4. Молекулярно-генетические аспекты анализа культур <i>in vitro</i>	478
8.4.1. Фитопатологический анализ	479
8.4.2. Выявление генетических нарушений	480
Литература	481