

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
ИННОВАЦИОННЫЙ ЕВРАЗИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

УДК 635.21.(574.25)

На правах рукописи

РИЖКОВА МАРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**Изучение биотехнологических аспектов культивирования каллусных
клеток картофеля**

6N0607 - Биология

Магистерская диссертация

Научный руководитель:
Д.в.н., профессор
Кафедры «Прикладная
биотехнология»
Никитин Е.Б.

Республика Казахстан
Павлодар, 2009

Работа выполнена в Инновационном Евразийском Университете на кафедре «Биология»

Научный руководитель д.вет.н., профессор кафедры «Прикладная биотехнология»

Никитин Е.Б..

Рецензенты: к.б.н., доцент, Даржуман Гульсара Канатовна

Защита состоится _____ на заседании Государственной аттестационной комиссии

(дата, время) кафедры «Биология» Инновационного Евразийского Университета (ИнЕУ) по адресу

г. Павлодар, ул. М. Горького 102/4, каб. 108

С магистерской диссертацией можно ознакомиться на кафедре «Биология» ИнЕУ

Секретарь Государственной аттестационной комиссии
кафедры «Биология» ИнЕУ _____

Карашашева Д. Б.

Нормоконтролер
Кафедры «Биология» _____

Шакенова Т. Ж.

АННОТАЦИЯ

В данной диссертации определены направления использования культуры тканей *in vitro* в целях сохранения и ускоренного размножения ценного селекционного материала. Метод культуры клеток и тканей растений основан на уникальном свойстве растительных клеток – тотипотентности, согласно которой любая, даже высоко специализированная клетка содержит полный объем генетической информации о структуре и функциях целого организма.

АНДАПТА

Бұл диссертацияда селекцияның материалды сақтау, қарнында көбейту мақсатына *in vitro* тіндерін пайдалану бағыттары анықталған. Клеткалар мен тіндерді пайдалану әдісі өсімдік клеткаларының ерекше қасиеті – тотипотенттігіне негізделген – тотипотенттік бойынша кез келген жоғары дәрежелі клетка организмнің генетикалық толып құрылымдық және функциялық бағдарламасын иемденеді.

ANNOTATION

This thesis shows the trends of culture tissues *in vitro* and it aims at keeping and accelerating the increase of valuable selective materials. The methods of cell culture and plant tissues based on unique planted cells like totipotent according to it any cell consists of genetic information volume, structure, function of the whole organism.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	7
1.1 Методы культивирования изолированных клеток и тканей растений	7
1.2 Соматональная изменчивость	12
1.3 Применение методов культуры тканей в селекции растений	16
1.4 Методы регенерации <i>in vitro</i> картофеля	20
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ	27
2.1 Исходный материал	27
2.2 Методика проведения исследований	35
3 ИНДУКЦИЯ ПРОЦЕССОВ КАЛЛУСОГЕНЕЗА И МОРФОГЕНЕЗА В КАЛЛУСНЫХ ТКАНЯХ КАРТОФЕЛЯ	38
3.1 Индукция процессов дедифференциации и каллу согенеза	38
3.2 Индукция процессов морфогенеза в каллусной ткани картофеля	43
3.3 Индукция процесса вризогенеза картофеля	46
4 Микроразмножение форм картофеля <i>in vitro</i>	51
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	54
ПРЕДЛОЖЕНИЯ И РЕКОМЕНДАЦИИ ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ	55
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	56

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Интенсификация сельскохозяйственного производства ставит перед селекционерами сложные задачи по созданию новых сортов, отличающихся высокой урожайностью, устойчивостью к болезням и вредителям, стрессовым факторам внешней среды, высокой пластичностью. Для создания сортов необходим поиск и привлечение современных достижений науки, ускоряющих и повышающих результативность селекционного процесса. Одним из наиболее динамично развивающихся направлений, ориентированных на создание нового исходного материала для селекции, является использование биотехнологических методов.

Культура клеток и тканей *in vitro* в настоящее время находит применение в широком диапазоне биологических исследований. Это стало возможным в результате разработки технологий культивирования тканей и клеток с последующей регенерацией из них фертильных растений.

При культивировании клеток и тканей картофеля наблюдается и генетическая стабильность регенерантов, полученных из каллусной культуры, подтвержденная анализом генетических маркеров (Демченко С.И. и др., 1977).

Изучение этих вопросов во многом определит дальнейшее использование культуры клеток и тканей *in vitro* для целей селекции. В методическом аспекте изучение означенных вопросов предполагает создание системы культивирования каллусных тканей, сохраняющих высокий морфогенетический потенциал в течение длительного времени, получение растений-регенерантов и их всестороннее изучение.

Цель настоящей работы состояла в разработке методов культивирования тканей картофеля *in vitro*, получении регенерантных растений с последующей их морфологической оценкой.

В задачи исследований входило:

- определение оптимальных составов питательных сред для индукции каллусогенеза, морфогенеза и ризогенеза в культуре соматических тканей картофеля;

- разработка эффективной системы активного пролиферационного и регенерационного процессов в длительно культивируемых каллусных тканях;

- разработка условий получения растений-регенерантов в культуре длительно пассируемых каллусов картофеля;

- сравнительный морфологический анализ растений-регенерантов, полученных в культуре длительно пассируемых каллусов картофеля;

- разработка метода отбора устойчивых к действию осмотического стресса каллусных линий картофеля;

- морфофизиологический анализ растений-регенерантов, полученных на селективных средах с осмотически активными веществами;

Научная новизна. Впервые разработан метод длительного субкультивирования каллусов картофеля с последующим получением

корнесобственных растений - регенерантов.

Практическая значимость работы* Определены направления использования культуры тканей *in vitro*. В целях сохранения и ускоренного размножения ценного селекционного материала рекомендуется метод микроразмножения. Для расширения спектра исходного материала в селекции картофеля рекомендуется использовать систему длительно пассируемых каллусных тканей.

Апробация работы. Международная научно-практическая конференция «Биологические, медицинские и психолого-педагогические проблемы адаптации».

Публикации. Вестник ИнЕУ. «Культивирование каллусных клеток растений».

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из общей характеристики, четырех глав, выводов, предложений и рекомендаций для селекции, списка литературы. Диссертация изложена на 66 страницах машинописного текста, включает 12 таблиц в тексте, 6 рисунков. Список цитируемой литературы содержит 157 наименований, из них 46 на иностранном языке.

1 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1 Методы культивирования изолированных клеток и тканей растений

Под термином «культура тканей и клеток растений» понимают выращивание *in vitro* изолированной клетки, ее отдельных структур, различных тканей, частей и органов растений в стерильных условиях на искусственных питательных средах (Калинин Ф.Л. и др., 1980).

Метод культуры клеток и тканей растений основан на уникальном свойстве растительных клеток – тотипотентности, согласно которой любая, даже высоко специализированная клетка содержит полный объем генетической информации о структуре и функциях целого организма. А потому, из одной клетки, путем дифференциации можно получить полноценное растение - регенерант (Бутенко Р.Г., 1964, 1970; Батыгина Т.Б. и др., 1978; Ezhova T.A., 2003). Дедифференциация составляет физиологическую основу данного метода, так как ввести ткань в культуру означает, прежде всего, индуцировать клеточные деления в тканях различной степени дифференциации. Получением целого растения - регенеранта в культуре ткани цикл клеточных превращений замыкается (Бутенко Р.Г., 1975; Дмитриева Н.Н., 1970).

При выборе материала предпочтение отдают меристематическим тканям и органам, поскольку их клетки активно делятся и удобны для культивирования, легче выживают в культуре, обладают большей скоростью роста и тотипотентностью (Бутенко Р.Г., 1999; Murashige T., 1974a; Калинин Ф.Л. и др., 1980; Evans D. et al., 1984a).

Значительно труднее создать контролируемые условия для выращивания дифференцированных тканей, закончивших рост, а также яйцеклеток, зиготы, зародышей, ранних этапов эмбриогенеза (Бутенко Р.Г., 1990).

Регенерацию растений из культуры тканей можно достичь, используя один из трех методов: культуру зародышей, соматический эмбриогенез и органогенез (Тиссера Б., 1989; Носов А.М., 1999).

Культура зародышей представляет собой стерильную культуру зиготических зародышей. Развитие и прорастание зародыша происходит на питательной среде так же, как это было и в семени (Здруйковская-Рихтер А.И., 1970, 1981, 1991; Понтович В.Э., 1970).

Другой механизм образования регенерантов - через соматический эмбриогенез. Соматический или неполовой эмбриогенез представляет собой процесс формирования зародышевых структур из соматических клеток. Соматический зародыш - это независимая двухполюсная структура, физически не прикрепленная к ткани, из которой происходит. В дальнейшем такие зародыши развиваются и прорастают в регенеранты через стадии, соответствующие тем, что встречаются при развитии зиготы (Батыгина Т.Б. и др., 1978; Батыгина Т.Б., 1999; Данилина А.Н., 1970; Tisserrat V. et al., 1978;

Ammirato P.V., 1983; Zimmerman A., 1993).

Формирование растений *in vitro* путем органогенеза состоит в появлении и росте побегов, корней или других органов из культивируемых клеток растений. Для регенерации целого растения таким способом обычно вызывают формирование побегов *in vitro*. Полученные побеги переносят на среду для укоренения. В результате образуется растение-регенерант (Бутенко Р.Г., 1975; Носов А.М., 2004). Опыт экспериментальной и практической работы показывает, что генетически наиболее стабильны организованные меристемы. Поэтому, регенерация растений через развитие побегов из пазушных почек является основой для промышленного клонального размножения многих растений (Катаева Н.В., Аветисов В.А., 1981; Катаева Н.В., Бутенко Р.Г., 1983; Высоцкий В.А., 1995).

Для получения культивируемых *in vitro* тканей и регенерантных растений различными исследователями были разработаны и предложены разнообразные питательные среды - Уайта, Готре, Нича, Мурашиге и Скуга, Хеллера, Гамборга, Эвелега и др. (Бутенко Р.Г., 1964; Калинин-Ф.Л. и др., 1980).

Основным типом культивируемых растительных клеток являются каллусные (Бутенко Р.Г., 1999; Дмитриева Н.Н., 1981; Кунах В.А., 1977). Н.Кренке, (1950) определял каллус, как один из типов тканей, участвующих в заживлении механических повреждений растений, который присущ всем высшим растениям. Каллусная культура *in vitro* - это неорганизованная пролиферирующая ткань, которая состоит из дедифференцированных клеток (Чайлахян М.Х. и др., 1982). Каллусную ткань *in vitro* можно получить практически из любой живой ткани растения.

Методы получения каллусной ткани из различных органов растений и регенерации из нее растений-регенерантов разрабатываются большим количеством независимых исследователей, которые установили общие закономерности образования каллусной ткани и регенерации растений из нее. Индукция каллусогенеза, пролиферация и регенерация зависят от целого ряда факторов.

Определяющим фактором получения каллусных культур является соотношение экзогенных гормональных препаратов в питательной среде (Кунах В.А., 1997; Катаева Н.В. и др., 1983; Дмитриева Н.Н., 1981; Murashige T., 1974b; Skoog F., Miller C, 1957).

Примеры формирования каллусной ткани и регенерации из нее обнаруживают исключительно большое разнообразие применяемых концентраций и соотношений регуляторов роста. Не существует общей формулы в отношении концентраций гормонов. При этом, специальная среда, разработанная, как правило, эмпирически для индукции дифференциации и органообразования у тканей одного вида, совсем не обязательно будет индуктивной в культуре тканей другого вида (Дмитриева Н.Н., 1981). Одна из главных причин такой вариабельности в ответе тканей на внешние гормональные факторы лежит в различной способности разных тканей синтезировать свои собственные эндогенные фитогормоны (Бутенко Р.Г., 1974,

1984; Дмитриева Н.Н., 1981; Лутова Л.А., Козырева О.Г., 1986; Долгих Ю.И. и др., 1999).

Многочисленные эксперименты отечественных и зарубежных исследователей выявили важную роль генотипа в управлении процессами роста и морфогенеза *in vitro*. Установлено, что пасленовые, крестоцветные, зонтичные легче индуцируют каллус и органогенез, тогда как бобовые и злаковые намного труднее ввести в культуру ткани (Бутенко Р.Г., 1990, 1999; Давоян Э.И., Сметанин А.П., 1979; Лутова Л.А. и др., 1994). Особенно сложно в этом случае получить из каллуса растения-регенеранты (Jacobsen Н.-J., 1992).

Существенное влияние на процессы каллусообразования, потенциальные возможности каллуса к дальнейшему пассируемому росту и разным типам морфогенеза оказывает видовая принадлежность растения. Выявлены различия в способности к образованию каллуса между различными видами люцерны (Мезенцев А.В., Карелина Н.А., 1982), томатов (Смирнов В.А. и др., 1985), овса (Омельянчук Н.А., Шумный В.К., 1986), хлопчатника (Быкова Е.В., Лев СВ., 1988), гречихи (Румянцева Н.И. и др., 1989), кукурузы (Чеченева Т.Н., Труханов В.А., 1994) и ряда других видов.

Не менее разительные отличия установлены и внутри вида. Одинаковые по возрасту и тканевой принадлежности первичные экспланты отличались по частоте каллусообразования в зависимости от исходного генотипа (сорта, линии). При изучении разных по генотипу растений ячменя показана зависимость инициации и интенсивности роста каллусов от генотипа исходных растений (Картель Н.А., Манешина Т.В., '1977). При сравнении исходной линии кукурузы и индуцированных из нее мутантов были выявлены формы, превосходящие исходную линию по способности к каллусообразованию почти в три раза (Кунах В.А. и др., 1980; Чернышева В.Г. и др., 1988). Изучение каллусо- и органогенеза у 30 сортов риса показало, что все сорта резко различаются по способности к органогенезу (Кучеренко Л.А., Мамаева 1980; Кучеренко Л.А., 1991).

Аналізу внутривидовой изменчивости, характеризующей признаки регенерации, посвящена работа Б.А. Левенко с соавторами (1977, 1978). В результате культивирования пыльников 29 сортов и линий твердой и мягкой пшеницы и 50 сортов томатов на различных питательных средах, сделан вывод о том, что способность пыльников образовывать каллус в значительной степени зависит от генотипа.

Анализ регенерационной способности различных видов пшеницы, эгилопса и кукурузы показал, что они заметно различались между собой по интенсивности каллусогенеза и регенерации растений (Карабаев М.К., Джардемалиев Ж.К., 1994).

Роль генотипа в проявлении морфогенной способности культивируемыми тканями показана на пшенице (Гапоненко А.К. и др., 1984), хлопчатнике (Тураев А., Шамина З.Б., 1986), люцерне (Мезенцев А.В., 1980), картофеле (Маруненко И.М. и др., 1988) ячмене (Литовкин К.В., Игнатова С.А., 2000), рисе (Давоян Э.И., 1987) и других культурах.

Однако морфогенетическая способность зависит не только от генотипа. Имеет значение и орган, от которого взят первичный эксплант. Зависимость процессов каллусогенеза и стеблевого морфогенеза в каллусных тканях от эпигенетических характеристик исходных тканей показана на достаточном фактическом материале. Приводятся данные о том, что у арабидопсиса ткани генеративного происхождения имеют более высокий морфогенный потенциал по сравнению с тканями вегетативного происхождения (Negrutti J. et al., 1975). Среди испытанных эксплантов озимой мягкой пшеницы — зрелые и незрелые зародыши, узлы кущения, корни, листья, незрелые соцветия, наилучшими оказались ткани зрелых зародышей (Бутенко Р.Г. и др., 1986а, 1986в; Карабаев М.К., Джардемалиев Ж.К., 1994).

Установлено, что различные соматические ткани растений риса довольно легко образуют каллус *in vitro*, за исключением листовых пластинок молодых и старых растений и эндосперма. Однако, способность к регенерации растений из полученного каллуса зависела от исходного экспланта. Максимальный выход регенерантов риса характерен при использовании для каллусогенеза зародышей зрелых семян (Кучеренко Л.А., Мамаева Г.Г., 1980; Кучеренко Л.А., 1994; Давоян Э.И., Сметанин А.П., 1979). Аналогичные результаты были получены при культивировании различных тканей табака (Миляева Э.Л. и др. 1972).

Более того, ткани одного и того же органа, проявляют разную способность к морфогенезу. Данный феномен впервые был обнаружен на ткани моркови корневого происхождения (Данилина А.Н., 1970). Было показано, что ткани флоэмного происхождения давали начало корням, а в тех же условиях ткани ксилемного происхождения формировали эмбриониды. В работе Миляевой Э.Л. с сотрудниками (Миляева Э.Л. и др., 1972) при изучении различных тканей стебля табака сорта Трапезонд показана зависимость образования каллусов и индукции морфогенеза в них от эпигенетических характеристик исходного материала.

Следовательно, культивируемые ткани гетерогенны по своему происхождению, так как слишком разные ткани составляют первичный эксплант. В процессе культивирования гетерогенность каллусной или суспензионной культуры не исчезает (Дмитриева Н.Н., 1981).

Несмотря на достаточно большой экспериментальный материал до сих пор не совсем ясно, чем определяется возможность - получения культивируемых тканей растений, сохраняющих морфогенетический потенциал — генетическими особенностями исходного генотипа, характером дифференцировки клеток экспланта или условиями выращивания (подбором питательных сред). По мнению Р.Г. Бутенко (1964, 1975, 1990) оптимальное сочетание всех трех факторов обеспечивает успех работы.

Каллусные клетки, возникшие из исходной ткани любого типа, могут неопределенно долго выращиваться в культуре как на агаризованной питательной среде в виде рыхлосвязанных клеточных масс, так и в жидкой среде в виде суспензии отдельных клеток или небольших групп (Бутенко Р.Г., 1975).

Поэтому массовое производство каллуса с последующей регенерацией побегов можно было бы считать идеальным методом крупномасштабного размножения, однако, в настоящее время существует два серьезных недостатка ограничивающих использование этого подхода.

Следствием длительного культивирования каллусных тканей *in vitro* является снижение или потеря морфогенетического потенциала. В то же время, возрастает число полиплоидных, анеуплоидных и других генетически абберантных клеток, а следовательно, и вероятность образования растений, отличающихся от исходной родительской формы (Дмитриева Н.Н., 1981; Фролова Л.В., 1981; Хасси Г. 1987; Гапоненко А.К., 1987; Бутенко Р.Г., 1970, 1975; Гостимский С.А., 1987; Кунах В.А., 1977а, 1979, 1999; Шамина З.Б. и др., 1970, 1966; Шамина З.Б., 1984).

Причины цитогенетической изменчивости культивируемых клеток и потеря ими морфогенетического потенциала разнообразны, механизм до сих пор не ясен, несмотря на широкую распространенность этого явления (Касаева К.А. 1989).

Тем не менее, имеется достаточно данных о сохранении длительно пассируемыми каллусными тканями относительной генетической стабильности и способности к морфогенезу. Описаны каллусные клоны пшеницы, сохранявшие регенерационную способность более года (Морозова С.Е., 1991; Косулина Л.Г., 1995). Из каллуса хризантем удавалось получать регенерантные растения в течение четырех лет, описаны каллусы фрезии (Хасси Г., 1987) и табака (Бутенко Р.Г. и др., 1967), сохраняющие способность к формированию органов и продуцирующие регенерантные растения в течение 4-10 лет.

Имеются сообщения и о клонах *Crepis capittaris* L. (Каллак Х.И. и др., 1991), *Rauwolfia serpentina* Benth. (Ковалева Т.А. и др., 1968), *Haplopappus gracilis* Nutt. (Сидоренко П.Г., Кунах В.А., 1970) стабильных в отношении цитогенетических характеристик.

С.И. Демченко с соавторами (1977) изучали генетически маркерные признаки при регенерации растений арабидопсиса из каллусной культуры, полученной из листьев взрослых растений. Сделан вывод о том, что относительно короткий период нахождения ткани в условиях каллусной культуры не вызывает изменения маркерных признаков.

Значительно уменьшить риск получения разнородного материала из каллусных культур возможно сокращая период каллусного роста до трех-четырех пассажей, удаляя старые некротические участки каллусной ткани, применяя низкие концентрации фитогормонов (Катаева Н.В., Бутенко Р.Г., 1983).

Несмотря на цитогенетическую изменчивость каллусных клеток и возможную регенерацию аномальных растений из каллуса и потерю им в процессе культивирования способности к морфогенезу, пролиферация каллуса с последующей регенерацией из него побегов или дифференциацией эмбриоидов является экономически выгодным, эффективным и в ряде случаев единственно возможным способом размножения растений в культуре *in vitro*

(Бутенко Р.Г., 1975).

1.2 Соматклональная изменчивость

Процесс культивирования клеток и тканей на искусственных питательных средах может сопровождаться возникновением значительного генетического разнообразия в популяциях клеток каллусных тканей и растений регенерантов, полученных из них.

Изменчивость в каллусных и суспензионных культурах было предложено рассматривать как нестабильность культуры тканей (Скаукрофт У.Р., 1990; Глеба Д.М., Глеба Ю.Ю., 1978; D'Amato F., 1985). Многие из этих изменений проявляются как наследственные мутации в потомстве растений регенерантов.

Для обозначения изменений, возникающих у регенерантных растений, P.J. Larkin, W.R. Scowcroft (1981) предложили специальный термин «соматклональные вариации», подчеркивающий происхождение таких изменений во время искусственного культивирования соматических клеток растений. Соматклональные вариации были обнаружены уже в первых работах по регенерации растений (Бутенко Р.Г. и др., 1967; Шамина З.Б. и др., 1966; Sacristan M.D., Melchers G., 1969).

Анализ растений регенерантов в настоящее время представляет собой один из самых доступных методов изучения генетической изменчивости в культуре клеток и тканей. Показано, что регенеранты, образующиеся из каллусных и суспензионных культур могут отличаться от исходных растений по многим морфологическим, биохимическим и физиологическим признакам и свойствам (Skirvin R., 1978; Larkin P.J. et al., 1983; Evans D.A., 1989; Фролова Л.В., 1984; Гостимский С.А., 1987; Гапоненко А.К., 1987).

Несмотря на то, что вариабельность в культурах клеток растений обнаружена давно и проанализирована в ряде обзоров (Фролова Л.В., 1981, 1984; Гостимский С.А., 1985; Шамина З.Б., 1978, 1987; Кунах В.А., 1999; Evans D.A. et al., 1984; Evans D.A., 1987, 1989; Larkin P.J. et al., 1983; Maliga P., 1980), генетическая природа и механизмы появления изменчивости до сих пор изучены недостаточно. Предполагается, что наблюдаемые изменения могут иметь физиологическую, эпигенетическую и генетическую природу. Чаще всего встречается физиологическая изменчивость, укладывающаяся в норму реакции данного генотипа. Как правило, физиологические изменения не имеют стабильного характера и исчезают при изменении условий культивирования (Шамина З.Б., 1978). Генетическая изменчивость вызвана мутациями, она наследуется не только в ряду клеточных поколений, но и в потомстве растений регенерантов. Естественно, этот тип изменчивости имеет наибольшее значение, так как именно он создает новые генотипы и расширяет спектр изменчивости генетического материала в селекции.

В настоящее время предложено несколько гипотез относительно генетических механизмов возникновения соматклональной изменчивости: изменения кариотипа, микроперестройки хромосом, изменения генома,

вызванные перемещением мобильных генетических элементов, соматический кроссинговер, генные перестройки, обусловленные дифференцировкой и т.д. (Skirvin R., 1978; Larkin P.J., Scowcroft W.R., 1984; Evans D.A., 1989; Долгих Ю.И., Шамина З.Б., 1991; Скаукрофт УР., 1990, Кунах В.А., 1999).

Прямые доказательства генетической природы изменчивости клеток растений при их искусственном культивировании были получены при цитологическом анализе числа и структуры хромосом (Загорска НА. и др., 1971; D'Amato F., 1985).

В обзоре M.V. Bayliss (1980) проанализировано поведение хромосом в клеточных культурах у более чем 55 видов растений. В различных типах клеток были обнаружены полиплоидные и анеуплоидные мутации, изменение структуры и морфологии хромосом, нарушения митоза. Детальный анализ динамики, уровня, типов и происхождения структурных перестроек хромосом в культуре тканей растений сделан В.А. Кунахом (1984а). Установлено, что изменения числа и структуры хромосом зависят от генотипа исходных эксплантов (вид, сорт, линия растения донора), от эпигенетического состояния культивируемого материала (род ткани, ее возраст, онтогенетическое развитие) и от условий культивирования.

Следствием генетических изменений в культивируемых *in vitro* клетках растений является появление фенотипических изменений у растений регенерантов. Y.Ogihara (1981) на цитологически удобном объекте *Haworthia setata* Haw. ($2n = 14$), у которого легко идентифицируются четыре пары крупных хромосом показал, что из 388 регенерантов 70% сохраняют нормальный диплоидный набор хромосом, а 30% характеризуются измененным кариотипом. Среди регенерантов также было обнаружено 13,7% тетраплоидов, 2% анеуплоидов и около 14% составляли растения с различными крупными перестройками хромосом.

Изменение числа и структуры хромосом в потомстве растений регенерантов отмечено у картофеля, моркови, люцерны, кукурузы, ячменя, банана (Ulrich S. et al., 1991; Кучко А.А., Маруненко И.М., 1991; Кунах В.А., 1980).

У регенерантов разных культур обнаруживаются не только изменения числа и структуры хромосом, но и типичные генные мутации. При анализе регенерантов кукурузы, полученных из незрелых зародышей, обнаружены хорошо дифференцируемые мутантные признаки хлорофильной недостаточности, и изменения морфологии эндосперма (Edallo S. et al., 1981),

Появление мутаций в потомстве растений регенерантов отмечено у томатов (Evans D., Sharp W.R., 1983), кукурузы (Шамина З.Б. и др., 1990), риса (Давоян Э.И., 1983). Показано, что выход мутантов при регенерации растений из культуры тканей может превосходить выход мутантов после обработки семян физическими мутагенами.

В обзоре УР. Скаукрофта (1990) представлен обширный список видов растений, у которых обнаружена соматическая изменчивость.

Несмотря на достаточно широкую распространенность соматических вариаций у растений регенерантов, вопрос о причинах их

возникновения остается до сих пор дискуссионным. Установлено, что основными причинами возникновения соматональных вариантов, прежде всего, являются генетическая гетерогенность соматических клеток исходного экспланта, а также непосредственно генетическая и эпигенетическая изменчивость, индуцируемая условиями культивирования *in vitro*. При этом частота образования вариантов определяется свойствами генотипа и исходного экспланта (Фролова Л.В., 1981; Сидоров В.А., Сидорова Н.В., 1987; Скаукрофт У.Р., 1990; Долгих Ю.И., Шамина З.Б., 1991; D'Amato F., 1985; Lee M., Phillips R.L., 1988).

Исследованиями на различных культурах установлено, что в меристематических тканях большинство клеток характеризуются видовым постоянством числа хромосом. Однако в ходе дифференцировки почти у 80% видов покрытосеменных растений в соматических клетках на разных этапах онтогенеза может происходить эндорепродукция хромосом, что и приводит к формированию тканей различного уровня плоидности (D'Amato F., 1985; Murashige T., 1974; Кунах В.А., 1994, 1995). Например, у гороха полиплоидные клетки обнаружены в корнях, семядолях, чашелистиках, бобах, пестиках, тычинках, а в листьях выявлены только диплоидные клетки.

Когда цитогенетически неоднородная ткань попадает в условия *in vitro*, к делению стимулируются как нормальные, так и полиплоидные клетки. Среди растений регенерантов хлорофильного мутанта табака 0,1-1,8% генетических вариантов имелись в исходной ткани (мезофилл листа), 1,4-6,0% обязаны своим происхождением условиям культивирования *in vitro* (Скаукрофт У.Р., 1990). Отсюда закономерно вытекает вывод о зависимости появления соматональных вариантов от типа исходного экспланта. Показано, что регенерантные растения пеларгонии (*Pelargonium* L'Herit), полученные из стеблевого каллуса имеют нормальную морфологию, а из каллуса корневого происхождения регенеранты формируются с внешней патологией (Skirvin R.M., Janick J., 1976).

Более существенную часть представляют геномные изменения, возникающие в процессе культивирования.

Установлено, что механическое повреждение, без которого, лишь в редких случаях получают культуру клеток *in vitro*, может вызывать генетические изменения (Кунах В.А., 1999). При индукции дедифференциации и дальнейшей пролиферации клетки *in vitro* подвергаются и другим воздействиям, как физическим, так и химическим, и пребывают в условиях существования, значительно отличных от таковых в интактном организме. Эти воздействия и условия часто превышают пределы нормы реакции исходного генотипа. Поэтому принято считать, что процесс каллусообразования и условия выращивания клеток *in vitro* являются мутагенными и обуславливают повышенную изменчивость (Кунах В.А., 1999; Larkin P.J., Scowcroft W.R., 1981).

Давно доказана определяющая роль регуляторов роста в индукции пролиферации клеток и контроле деления (Загорска Н.А. и др., 1971; Бутенко Р.Г., 1974; Кацы Е.И., 1997; Каллак Х.И., Кыйвеэр А.Ю., 1991). В то же время

известно, что экзогенные фитогормоны - цитокинины, ауксины, гибберриллины и, особенно, их синтетические аналоги существенно влияют на геномную изменчивость культивируемых клеток (Кунах В.А., Зосимович В.П., 1977; Кунах В.А. и др., 1977; Захленюк О.В. и др., 1986; Захленюк О.В., Кунах В.А., 1998).

Длительное применение экзогенных регуляторов роста в культуре ткани гаглопаппуса (*Haplopappus gracilis* Nutt.) может приводить к увеличению плоидности и формированию миксоплоидных клеток (Кунах В.А., Алпатова Л.К., 1979; Шамина З.Б., 1970).

Согласно концепции З.Б. Шаминой (1987) изолирование клеток из интактного растения, нарушая гормональную регуляцию, индуцирует аномалии в функционировании митотического аппарата. Эти аномалии реализуются в клетках различной плоидности, присутствующих в исходных эксплантах. В зависимости от состава и соотношения экзогенных регуляторов роста происходит индукция к делению различных типов клеток. Вероятно, все это и приводит к нарастанию миксоплоидии, повышению вероятности появления хромосомных aberrаций.

Большинство исследователей отмечают, что длительное пассирование клеток *in vitro* способствует повышению генетического разнообразия, как среди культивируемых клеток, так и полученных из них растений (Катаева Н.В., Бутенко Р.Г., 1983; Носов А.М., 1999; Сидоров В.А., Сидорова Н.В., 1987; Шамина З.Б., 1987; Долгих Ю.И., Шамина З.Б., 1991; Скаукрофт УР., 1990; Skirvin R.M., Jamck J., 1976; Larkin P.J., Scowcroft W.R., 1981; Сидоренко П.Г., Кунах В.А., 1970).

Установлено, что после 4^x месяцев культивирования каллусных клеток овса (McCoy T. et al., 1982) частота аномальных регенерантов составляла 12%. После 20 месяцев культивирования этот показатель возрос до 47%. Увеличение продолжительности субкультивирования с 2 до 14 месяцев приводило к снижению доли жизнеспособных регенерантов кукурузы. Возрастало число растений с укороченными междоузлиями, стерильных и бесхлорофильных (Долгих Ю.И. и др., 1992). Частота соматоклональных вариантов риса увеличивалась с увеличением продолжительности периода культивирования каллусных тканей из которых были получены растения-регенеранты. Регенерантные растения отличались от контроля по высоте растения, строению и длине метелки, форме и величине зерновок, листьев, вегетационному периоду (Давоян Э.И., 1983; Кучеренко Л.А., 1984).

При культивировании растительных клеток *in vitro* перечисленные факторы присутствуют всегда вместе. Поэтому достаточно трудно, а иногда и невозможно подобрать к ним контрольный вариант в эксперименте (Фролова Л.В., 1981; Кунах В.А., 1999; Хавкин Э.Е., Забродина М.В., 1994; Носов А.М., 1999). Тем не менее можно заключить, что соматоклональная изменчивость явление широко распространенное и генетически доказанное на достаточно обширном фактическом материале. С практической точки зрения соматоклональная изменчивость может носить как положительный, так и отрицательный характер. В том случае, если необходимо получение

однородного материала соматональная изменчивость явление нежелательное и должно быть сведено к минимуму. Если ставится цель расширить спектр генотипической изменчивости в культуре клеток *in vitro* степень соматональной вариабельности необходимо усилить. Одно из основных преимуществ соматональной изменчивости заключается в создании дополнительной генетической изменчивости у ценных сельскохозяйственных сортов без гибридизации. Эта изменчивость приобретает дополнительные преимущества, если возможна селекция в системе *in vitro* или имеются методы быстрой оценки растений.

В детальных обзорах W.R. Scowcroft (Scowcroft W.R., Larkin P., 1983; Скаукрофт У .Р., 1990), P. Maliga (1984), R.S. Chaleff (1983), P.J. Larkin (1983), Р.Г.Бутенко и С.А.Гостимского (1985) показано, что варьирование, наблюдаемое среди растений-регенерантов значительно расширяет пределы существующей изменчивости и с успехом может, быть использовано в селекционно-генетических программах.

1.3 Применение методов культуры тканей в селекции растений

Методы культуры клеток и тканей растений *in vitro* в настоящее время настолько быстро развиваются, что находят все более широкое применение в сельскохозяйственной науке и практике.

Использование этих методов в селекционно-генетических исследованиях к настоящему времени позволило решить ряд проблем, связанных с увеличением продуктивности и улучшением качества некоторых сельскохозяйственных культур. В особенности это касается той области проблем, где применение традиционных методов генетики и селекции практически невозможно или связано со значительными трудностями (Бутенко Р.Г., 1986, Павловская Н.Е. и др., 1998).

Метод культивирования незрелых зародышей применен более чем у 70 видов растений. В результате исследований по культуре зародышей *in vitro*, проведенных в селекционно-генетическом плане, получено много новых форм, ценных в практическом плане (Атанасов А.И., 1993).

Культура незрелых или абортивных зародышей удачно использована в ВИРе при получении жизнеспособных межвидовых гибридов между *L. esculentum* Mill, (томаг) и *S. lycopersicoides* Dun. (дикий клубненосный вид картофеля) (Суриков И.М., и др., 1986; Суриков И.М, Воробьева Г.А., 1987),

Культура изолированных зародышей активно используется при гибридизации плодовых культур (Еникеев Х.К. и др., 1984), в межвидовой гибридизации хлопчатника (Азизходжаев А., Даминова Д.М., 1991), гречихи (Суворова Г.Н., 1992), табака (Терновский М.Ф. и др., 1972,1976).

Культура *in vitro* изолированных семязпочек и потерявших всхожесть семян используется для сохранения важного для селекции материала при повреждении растений. Такое применение метода, описано для подсолнечника (Плотников В.А., 1983), картофеля (Кучко А.А., Маруненко И.М., 1983).

Существенный вклад в ускорение селекционного процесса и разработку новых технологий селекции могут внести технологии получения экспериментальных гаплоидов и на их основе гомозиготных дигаплоидных линий. Спонтанная гаплоидия — явление редкое, однако постоянно встречающееся у многих видов растений. Обычно частота гаплоидии не превышает 0,1%, однако известны случаи, когда она достигала 15% (Кунах В.А., 1980.1995; Кириллова Г.А., 1966).

Между тем, гаплоидные растения имеют исключительное значение для мутационной селекции и, особенно, для ускоренного получения гомозиготных генетически стабильных линий (Гапоненко А.К., 1987; Рахимбаев И.Р. и др., 1990; Дьячук Т.Н., Дьячук П.А.. 1989).

К настоящему времени гаплоидные растения получены более чем у 50 видов растений, в том числе у таких экономически важных, как пшеница, рис, кукуруза, ячмень, картофель, табак, рапс, лен, перец, апельсин, виноград, яблоня и др. (Шамина З.Б., 1981; Атанасов А.И., 1993; Юркова Г.Н., Левенко Б.А., 1982; Маруненко И.М. и др., 1988).

Успехи, достигнутые в практическом использовании гаплоидов в селекции за последние десятилетия, достаточно очевидны и привлекают внимание селекционеров к этому методу во многих странах. Наиболее широко гаплоидия применяется китайскими исследователями. С использованием метода культуры пыльников в Китае созданы новые высокоурожайные сорта риса и пшеницы. Урожайность сорта риса Таноренг 1 достигает более 80 ц/га, что на 21,4% превышает стандарт. Культура пыльников используется и в гетерозисной селекции при создании высокоинбредных линий. Получена высокоурожайная, устойчивая к болезням гибридная кукуруза, а также шесть перспективных сортов риса. В Канаде за 5 лет (включая официальные испытания в течение двух лет) были созданы дигаплоидные сорта ячменя Минго и Родео, которые характеризуются высокой урожайностью, крупным зерном, легкой вымолачиваемостью. По мнению канадских исследователей, срок выведения сортов ячменя путем дигаплоидной селекции сокращается на 5 лет по сравнению с их получением методом педигри. Во Франции создан новый сорт озимой пшеницы Флорин, на выведение которого было затрачено на 4 года меньше, чем потребовалось бы при традиционной селекции.

Гаплоиды успешно используются также и в клеточной селекции. При культивировании пыльников на средах с высокими концентрациями солей были получены солеустойчивые растения ячменя. Используя в качестве селективного агента аминокислотные аналоги, удалось улучшить белковый состав зерна риса (Брайт С. и др.. 1987).

Основной задачей практически любой селекционной программы является расширение диапазона генетической изменчивости с целью отбора или введения желаемых признаков для улучшения возделываемых сортов сельскохозяйственных культур. Варьирование, наблюдаемое среди растений -регенерантов, значительно расширяет пределы существующей изменчивости и с успехом может быть использовано в селекционной работе. Кроме того, из-за

специфичности условий в культуре *in vitro* могут быть получены такие типы мутаций, которые в условиях *in vivo* благодаря диплоидному отбору, действующему, как правило, в пользу нормальных, неизмененных клеток, просто невозможно было бы получить (Давоян Э.И., 1983; Скаукрофт УР., 1990).

Американские исследователи (Evans D.A. et al., 1984a, 1987) показали, что использование соматоклональных вариантов может в два раза ускорить процесс создания нового сорта. Ученые получили и изучили соматоклональные варианты томатов с такими важными признаками, как цвет и форма плодов, форма куста, легко обламывающаяся плодоножка.

Отмечены случаи появления соматоклональных вариантов, сочетающих признаки, которые невозможно или трудно соединить в одном генотипе традиционными селекционными методами. Из соматоклональных вариантов, возникших в каллусной культуре риса, выделены растения, сочетающие скороспелость и длиннозерность. На их основе за короткий срок был создан сорт риса «Биориза» (Кучеренко Л.А. и др., 1986; Кучеренко Л.А., 1991). В Малайзии из клеточного клона регенерировали масличную пальму с повышенной устойчивостью к фитопатогенам и более высоким (на 20-30%) содержанием масла. В Австралии из клеточных клонов вырастили солеустойчивые красные камедные деревья, способные расти на засоленных почвах (Егоров Н.С. и др., 1987).

Однако преимущества соматоклональной изменчивости перед обычной мутационной селекцией проявляются в наибольшей степени в том случае, если испытание и отбор генотипов ведутся *in vitro* с использованием селективных сред. При таком отборе осуществляется скрининг миллионов генотипов. Наиболее часто в клеточной селекции используется скрининг на устойчивость к солям, осмотикам, экстремальным температурам, токсинам патогенов, аналогам аминокислот, гербицидам (Касаева К.А., 1989; Бутенко Р.Г., 1990; Копертех Л.Г., Бутенко Р.Г., 1997; Долгих Ю.И., 2004).

Имеется немало примеров получения резистентных или толерантных растений методом клеточной селекции. Большое число ценных соматоклональных вариаций выявлено у сахарного тростника. Среди растений-регенерантов сахарного тростника выделены формы устойчивые к вирусу Фиджи, к токсинам гриба *Helminthosporium sacchari* (Heinz et al., 1977), с утолщенным стеблем, повышенной урожайностью и сахаристостью (Larkin P.J., Scowcroft W.R., 1983).

Получены соматоклональные линии картофеля, превосходящие исходные сорта по урожайности, устойчивости к фитофторе и некоторым вирусам (Киселев Е.П., Анненков Б., 1989; Мелик-Саркисов О.С., Аветисов В.А., 1986).

Получение соматоклонов наиболее важно для селекции зерновых злаков, сорта которых создаются традиционными методами на узкой наследственной основе. Анализ соматоклонов, выделенных разными группами исследователей из каллусов сортов озимой и яровой мягкой пшеницы (*T. aestivum* L.) показал большую изменчивость среди соматоклонов и отличие их от исходного сорта по

морфологическим признакам. Методом «индивидуального» отбора из потомства растений-регенерантов Казахскими учеными созданы и переданы в государственное сортоиспытание три сорта яровой мягкой пшеницы (Alimgazinova B.S., 2003). Среди растений регенерантов мягкой пшеницы обнаружены наследуемые изменения высоты растения, числа зерен в колосе, массы зерна с колоса, урожайности, содержания белков и ряда ферментов (Maddock S. et al., 1986; Larkin P., Scowcroft W.R., 1981; Гапоненко А.К. и др., 1985). Получены соматклоны пшеницы с измененным спектром полипептида глиаина, что открывает возможность их использования в качестве исходного материала в селекционном процессе на качество (Larkin P J. et al 1984). Среди регенерантов кукурузы выделены мутанты с мужской стерильностью, измененным содержанием аминокислот, различной высотой стебля и другими признаками (Lee M. et al., 1988). Ценные изменения морфологических и физиологических признаков отобраны у растений-регенерантов риса (Давоян Э.И., 1983).

Определенные успехи достигнуты клеточной селекцией на устойчивость к засолению, тесно соприкасающиеся с проблемой засухоустойчивости, так как в основе обоих явлений лежит механизм осморегуляции у растений. Выделена линия табака, на порядок превышающая по устойчивости исходную линию и получены растения табака, в 5 раз превышающие по устойчивости исходную форму (Касаева К.А., 1989).

Одно из наиболее хозяйственно важных и разработанных направлений - это применение культуры тканей и клеток для клонального размножения растений.

В настоящее время известны технологии ускоренного микроразмножения в условиях *in vitro* более 270 видов растений. Для 70 из них это методы экономически эффективны. Численность видов, микроразмножение которых имеет экономически выгодное значение, непрерывно увеличивается (Лилов Д., Изворска Н., 1990).

Классическим примером эффективного применения техники микроразмножения является размножение гвинейской масличной пальмы (*Elaeis guineensis* Jacq.) занимающей второе место среди масличных культур в мире. Метод клонирования *in vitro* позволил довести коэффициент размножения в предельно короткие сроки до создания промышленных плантаций в странах Западной Африки, Колумбии, Индонезии и Малайзии (СассонА., 1987).

Большое практическое значение имеет микроразмножение гевеи бразильской. Это растение широко используется для получения натурального каучука, спрос на который постоянно растет. Гевея эксплуатируется только до определенного возраста, после чего ее заменяют новыми растениями. Потребность в значительном количестве посадочного материала побудила исследователей разработать метод клонального микроразмножения гевеи (Артамонов В.И., 1989).

Область применения методов клонального микроразмножения

постоянно расширяется. В настоящее время в ряде стран (Великобритания, Германия, Голландия, США, Италия) уже невозможно представить систему промышленного размножения оздоровленного посадочного материала без широкого использования методов культуры изолированных тканей и органов. Это в первую очередь касается таких цветочно-декоративных культур, как орхидея, гвоздика, гербера, хризантема, сирень, роза, клематис и ряда других (Морель Ж., 1967; Высоцкий В.В., 1995; Митрофанова О.В., 1986).

Производство оздоровленного посадочного материала цветочных и плодово-ягодных культур с применением техники микроразмножения *in vitro* приобрело промышленное значение и в России. (Кубалакова М.И., Гавел Л., 1991; Джигадло Е.Н. и др., 2004; Высоцкий В.А. и др., 1998; Бургутин А.Б., 1991; Нам И.Я. и др., 1998).

У многих овощных культур промышленное производство основано на гетерозисных гибридах. Создание родительских линий, их размножение и сохранение генетической однородности можно обеспечить клонированием *in vitro*. Среди овощных растений работа в этом направлении ведется с картофелем, капустой, спаржей, чесноком, томатами, сахарной свеклой и другими культурами (Катаева И.В., Аветисов В.А., 1981; Киселев Е.П., Анненков Б.Г., 1989; Атанасов А., 1993).

Разработаны методы микроразмножения для сохранения ценных генотипов зернобобовых культур (Соболева Г.В., 1992; Соболева Г.В., Кострубин М.М., 1993; Лговенко Т.В., 1997; Костюченко Д.А., 2004). Методы микроразмножения активно используются для тиражирования ценных селекционных образцов кормовых трав. Особенно при недостатке семян на ранних этапах селекционного процесса (Новоселова А.С., Мазин В.В., 1986; Игнатова С.А. и др., 1991; Bliznyuk L.G., Kondratskaya I.P., 2003).

В настоящее время разработаны и усовершенствованы технологии клонального микроразмножения 85 видов, относящихся к 28 семействам редких и ценных видов растений. В процессе работы был создан банк ценных генотипов стерильных культур, содержащий растения более 600 генотипов, являющийся одним из путей сохранения биоразнообразия растений (Molkanova O.I. et al., 2003).

Итак, сочетание методов эмбриокультуры, гаплоидии и дигагоюидии, соматического эмбриогенеза, соматической изменчивости, микроразмножения с традиционными методами генетики и селекции позволят значительно ускорить селекционный процесс, и в дальнейшем будут способствовать улучшению качества и продуктивности экономически важных сельскохозяйственных культур.

1.4 Методы регенерации *in vitro* картофеля

Картофель является одной из ведущих культур, широко возделываемой в различных регионах Казахстана. Решающее значение для дальнейшей интенсификации сельскохозяйственного производства имеет создание высокопродуктивных, устойчивых к болезням и неблагоприятным факторам

окружающей среды сортов с высокими пищевыми достоинствами различных направлений хозяйственного использования. Успех селекционной работы во многом определяется наличием исходного материала, в расширении спектра которого могут быть использованы биотехнологические методы. Возможности использования методов регенерации *in vitro* для селекции картофеля изучены явно недостаточно.

Картофель был введен в культуру *in vitro* давно. Впервые J.G. Torrey, J. Shigemura (1957) наблюдали рост недифференцированной ткани картофеля, полученной в культуре изолированных корней при помещении ее в жидкую питательную среду с различными концентрациями 2,4-Д и дрожжевого экстракта.

Группой ученых под руководством А.С. Хильдебранта было описано развитие каллусной ткани *in vitro*, полученной от кусочков, стебля (Hildebrandt A.C. et al., 1963).

В опытах Р.Г. Бутенко (1964) культура каллусной ткани картофеля была получена из тканей ростка. Каллусная ткань картофеля, индуцированная из изолированных ростков была получена Х.И. Каллак и Л.Я. Ярвекюльг (1970), а также в экспериментах, проведенных под руководством О.Ф. Михайлова (Бессонова В.П., 1970; Бессонова В.П., Михайлов О.Ф., 1970; Михайлов О.Ф., Бессонова В.П., 1970, 1971),

Впервые сравнительное изучение способности изолированных органов к каллусообразованию *in vitro* для 23 образцов картофеля было проведено Л.Н. Мурашко и Т.С. Фадеевой (1973). Интенсивность каллусообразования у эксплантов, полученных из разных органов изученных сортов и линий, оказалась весьма неодинаковой. Для всех образцов был показан общий ряд увеличения способности органов к восстановительному морфогенезу: корень листовая пластинка - черешок листа — стебель - цветок - эпикотиль. Были обнаружены межсортовые и межлинейные различия в процессах регенерации - интенсивности каллусообразования, типе возникающего каллуса. Успешное формирование каллуса из эксплантов стеблей, листьев, гипокотилей, эпикотилей, цветочных бутонов, апикальных меристем было показано в работе S. Gosal, Y. Bajaj (1979).

Наиболее детально вопросы определения условий, индуцирующих каллусогенез у картофеля, были изучены группой исследователей под руководством Н.-J. Jacobsen (Jacobsen Н.-J., 1976, 1980; Jacobsen Н.-J., Salha А.А., 1984; Ingensiep Н.W. et al., 1977; Herlt M. et al., 1979). Результаты этих экспериментов показали, что эффективность индукции каллусогенеза зависит не только от исходного генотипа и тканевой принадлежности первичных эксплантов, но и от минеральной основы питательных сред и комбинации гормонов. Большинство исследователей отмечают, что характерной особенностью каллусной ткани картофеля является ее медленный рост. Длительность пассажа составляет в среднем 2-3 месяца (Jacobsen Н.-J., 1992; Юркова Т.Н. и др., 1977).

Возможности использования культуры каллусов связаны, прежде всего, с разработкой простых и эффективных методов регенерации. Регенерация

целых растений из культивируемых каллусных тканей *in vitro* может осуществляться двумя способами: методом ступенчатого органогенеза (образование в недифференцированной культуре тканей регенерационных меристемных зон, из которых впоследствии формируются корневые апексы) или путем соматического эмбриогенеза (с образованием зародышеобразных структур), которые часто, но не всегда четко различаются.

Несмотря на достаточно обширный список исходных эксплантов, способных к индукции каллуса, регенерация растений картофеля достигнута только для некоторых типов тканей. В первом сообщении (Gamborg O. et al., 1974) регенерация побегов путем органогенеза была осуществлена из каллусов, полученных из мацерированной клеточной массы стеблевых апексов 3-4 дневных проростков картофеля. Возможность регенерации побегов из каллусной культуры эпикотилей 3-5 дневных проростков показана R. Malmberg (1979a, 1982). В течение первых двух месяцев культивирования *in vitro* регенеранты были получены у шести линий из шестнадцати изученных сортообразцов. Через четыре месяца способностью к регенерации обладали четыре линии, а через шесть месяцев с трудом добились регенерации побегов лишь у двух линий.

В работе В.А. Кунаха с соавторами (1984г.) регенерация побегов была достигнута из пересадочных каллусных тканей листового и стеблевого происхождения сорта Уладовский юбилейный и линии 1072. Интересно отметить, что, по данным Т.А. Ежовой с соавторами (1985), линия 1072 не была способна формировать побеги. Авторами этих исследований было показано существование определенных трудностей и различий в ростовом и регенерационном потенциале различных генотипов картофеля. R. Malmberg (1979b) установил, что только 6 из 16 изогенных линий картофеля регенерируют побеги из каллусов эпикотильного происхождения. Сходные результаты получены А. Rublio с сотрудниками (1982г.), когда 5 из 9 изученных сортов картофеля оказались способными к регенерации растений из культивируемых незрелых листочков, В экспериментах G. Hussey, H.V. Gunn (1984г.) только 2 из 5 изученных генотипов картофеля оказались способными к регенерации.

Детальный анализ условий побегообразования в каллусной культуре картофеля с использованием различных органов 25 генетически маркированных линий и сортов картофеля был проведен Т.А. Ежовой с соавторами (1985). Для всех использованных форм, показана возможность регенерировать побеги каллусами из измельченных стеблевых апикальных меристем (7,1-85% каллусов с побегами). Способность регенерировать побеги из эпикотилей, междоузлий и листьев обладали не все исследованные генотипы. Процент каллусов с побегами составлял для разных линий: 0-31,3% (эпикотили), 0-11,1% (междоузлия), 0-5,1% (листья). Было также показано, что способностью формировать побеги обладают каллусы, полученные из тканей 3-7 дневных проростков.

Л.А. Лутовой и Е.А. Забелиной (1988) был проведен анализ 32 различных генотипов картофеля по способности к регенерации. Показано, что характер регенерации зависит не только от тканевой принадлежности

эксплантов. Изученные сорта и линии картофеля различались по способности к органогенезу при одинаковых условиях культивирования *in vitro*. Это свидетельствует о генетической обусловленности морфогенетических способностей культивируемой ткани и о возможности отбора генотипов, характеризующихся повышенными морфогенетическими потенциями.

Дальнейшие исследования показали, что регенерация растений может быть достигнута при использовании в качестве исходных эксплантов зрелых и незрелых зародышей (Devreux M., 1970; Atanassov A.J., Mehandjiev A.D., 1979; Stafford A., Davies D.R., 1979; Natali L., Cavallini A., 1987a), семядольных узлов (Jackson J., Hobbs S., 1990), сегментов эпикотилей (Nielsen S. et al., 1991).

Успех в решении проблем управляемого морфогенеза и регенерации побегов *in vitro* во многом определяется гормональным балансом питательных сред. В этом качестве использовались различные концентрации и сочетания ауксинов и цитокининов. Так в ряде исследований (Кунах В.А. и др., 1984b; Каллак Х.И., Кыйвеэр А.Ю., 1991; Fillippone E., Cardi T., 1986; Jacobsen H.-I. et al., 1980; Rubluo A. et al., 1982), было показано, что успешная индукция каллусообразования у картофеля наблюдалась при использовании пиклорама или 2,4-Д (2,4 -дихлорфеноксисукусная кислота) в концентрации 5-10 мг/л. Но в тоже время, авторы добавляют, что ткани, выращенные на средах с 2,4-Д и пиклорамом не способны к органогенезу.

Комбинации 2,4-Д и циклорама с цитокининами также оказались неэффективны в индукции морфогенеза, хотя эффективно индуцировали рост каллусных тканей. Результаты дальнейших исследований показали, что комбинации, включающие БАЛ с НУК ИУК и ИМК могут быть использованы для регенерации растений из культуры тканей паслёновых (Юркова Г.Н. и др., 1977; Neskovic M., Radojevic L., 1975; Griga M. et al., 1984b; Rubluo A. et al 1984; Malmberg R., 1979b). При этом, комбинации, включающие БАП и НУК наиболее успешно индуцируют процессы регенерации из тканей картофеля.

Установлено, что индукция каллусогенеза осуществляется на средах с повышенным содержанием ауксинов. Побегообразование наиболее эффективно осуществляется при смещении ауксин-цитокенинового баланса среды в сторону относительно увеличения содержания цитокининов (Кострубин М.М. и др., 1992; Griga M. et al., 1984b; Ежова Т.А. и др., 1985, 1987). Полученные данные достигались эмпирическим путем, поэтому обнаружено большое разнообразие в отношении конкретно применяемых концентраций и соотношений регуляторов роста.

Значительный интерес представляет разработка системы регенерации картофеля через соматический эмбриогенез. Первые попытки индуцировать развитие зародышеобразных структур в каллусной культуре сегментов стеблей и листочков картофеля были предприняты в середине восьмидесятых годов (Jacobsen H.-L, Kysely W., 1984, 1986; Kysely W., 1985). Авторы наблюдали развитие эмбриоидов, но морфогенеза побегов добиться не удалось. В другой серии опытов, регенерация растений путем соматического эмбриогенеза была достигнута с использованием каллусных тканей,

полученных из незрелых зародышей или сегментов побеговых апексов (Kysely W. et al., 1987).

Дальнейшие исследования показали эффективность образования соматических эмбриоидов из каллусных тканей, полученных из незрелых зародышей и сегментов побеговых апексов (Kysely W., Jacobsen H.-I., 1990; Griga M. et al., 1992; Steiskal J., Griga M., 1992; Van Doorne L. et al., 1991, 1995; Ozcan S. et al., 1993). Первое сообщение о получении соматических эмбриоидов из незрелых зиготических зародышей было сделано Т. ТеШ (1990). Позднее появились сообщения об индукции соматических эмбриоидов из апикальных меристем картофеля (Loiseau J. et al., 1995; Griga M., 1998).

Большой интерес и практическое значение представляет разработка технологии клонального микроразмножения картофеля из апикальных и аксиллярных меристем. Меристематические клетки менее дифференцированы и генетически более стабильны, чем клетки специализированных тканей, в результате чего регенерантное потомство проявляет высокую генетическую стабильность. Техника микроразмножения была с успехом применена для размножения ценного исходного материала, получения безвирусных растений (Kartha K. et al., 1979; Griga M. et al., 1984a; Внучкова В.А., Попова И.А., 1987). В последнее время возрос интерес к культивированию меристематических тканей как к важной составной части технологии длительной криоконсервации растительных тканей и создания генетических банков зародышевой плазмы картофеля (Kartha K.K. et al., 1979; Haskins R., Kartha K.K., 1980). Одним из наиболее сложных этапов культивирования изолированных тканей картофеля можно считать индукцию ризогенеза. В литературе до настоящего времени практически нет сведений о физиологических условиях формирования корней у растений-регенерантов и конкретных рекомендаций по проведению этого этапа работы. Установлено, что определяющим фактором индукции ризогенеза у картофеля является содержание экзогенных ауксинов в питательной среде (Kartha K.K. et al., 1974; Eliasson L., Arebland K.K., 1984; Kubalakova M. et al., 1988; Cardi T. et al., 1991).

Относительно легко корнеобразование достигается у регенерантных побегов, полученных путем прямого органогенеза из апикальных меристем при клональном микроразмножении (Kartha K., 1984; Kallak H., Koiveer A., 1990). В данном случае, эффективность ризогенеза может достигать 90% (Kubalakova M. et al., 1988).

Попытки индуцировать ризогенез у регенерантных побегов в каллусной культуре и получить корнесобственные растения-регенеранты не увенчались успехом (Кунах В.А. и др., 1984b) или эффективность корнеобразования была низкой (Gamborg O. et al., 1974; Rubluo A, et al. 1984). Так, Л.А. Лутова и Е.К. Забелина (1988), анализируя регенерационный потенциал 32 генотипов картофеля по способности к корне- и каллусообразованию, не приводят данных по методике ризогенеза, сообщая только о получении незначительного числа регенерантов и о том, что укоренение сопряжено со многими трудностями.

Анализ литературных данных по индукции ризогенеза у побегов,

образованных в культуре каллусов показал, что образование корней может осуществляться на питательных средах Мурашиге-Скуга (Murashige T., Skoog F., 1962) или Гамборга (Gamborg O.L. et al., 1968). Причем эффективность ризогенеза остается довольно низкой. В работе L. Natali, A. Cavallini (1987a) сообщается, что эффективность ризогенеза составляла всего 18,7%. Причем, только несколько растений смогли укорениться в почве и сформировать клубни.

Побеги, полученные из относительно молодых каллусов, возрастом до одного года, укореняются значительно легче, чем побеги из более старых каллусов, которые к тому же с трудом приживаются в почве (Hussey G., Gunn H.V., 1984; Ежова Т.А. и др., 1988; Внучкова В.А., Попова И.А., 1987; Михайлова-Крумова А.Б., 1991).

Таким образом, наиболее сложной проблемой остается индукция ризогенеза у побегов, полученных в каллусной культуре.

Исследование проблем регенерации картофеля *in vitro* тесно связано с изучением цитогенетических характеристик каллусных тканей и растений-регенерантов. Цитогенетический анализ показал, что в каллусной ткани картофеля, культивируемой *in vitro*, могут быть обнаружены разные отклонения от диплоидного набора хромосом (Каллак Х., Ярвекюльг Л., 1968, 1970; Бессонова В.П., Михайлов О.Ф., 1970; Фролова Л.В., Шамина З.Б., 1974).

В.А. Кунах с сотрудниками показали, что пloidность первичного каллуса зависит от тканевой принадлежности исходного экспланта и состава питательной среды и практически не зависит от сорта растения. Самая общая тенденция в изолированных тканях - повышение с возрастом культивирования частоты появления хромосомных aberrаций, полиплоидных и анеуплоидных клеток (Каллак Х., Ярвекюльг Л., 1970; Ежова Т.А. и др., 1988). По мнению ряда авторов (De K., Roy S., 1985; Natali L., Cavallini A., 1987b; Кунах В.А., 1984; Ежова Т.А. и др., 1987, 1988), именно с появлением aberrантных и полиплоидных клеток связано появление соматоклональных вариаций среди регенерантных растений. В то же время, авторы отмечают, что регенерантные растения характеризуются меньшей хромосомной вариабельностью по сравнению с исходными каллусными культурами. Вероятно, это связано с большей жизнеспособностью сбалансированных генотипов по сравнению с регенерантами, имеющими кариотипические изменения. Таким образом, происходит элиминация большинства кариотипических аномалий. Поэтому большинство исследователей сообщают о сохранении генетической стабильности потомства регенерантных растений картофеля, полученных из каллусных культур (Rubluo A. et al., 1984; Hussey G., Gunn H.V., 1984; Natali L., Cavallini A., 1987b; Ежова Т.А. и др., 1987).

М. Griga (1990) приводит данные о генетической стабильности регенерантов, полученных из организованных меристем и их семенных потомств, подтвержденные цитологическим анализом и оценкой фенотипа в полевых условиях. Несмотря на относительную стабильность набора хромосом у регенерантов, ряд авторов отмечают появление среди них мутаций, которые принято называть соматоклональными вариациями.

Многие авторы отмечали появление значительных отклонений от нормы среди регенерантных растений поколения Ro (Ежова Т.А. и др., 1989; Griga M. et al., 1995; Гостимский С.А. и др., 1985). Т.А. Ежова с соавторами (1989) у 10% регенерантов наблюдали такие морфологические изменения, как укорочение междоузлий, изменение морфологии листьев и цветков. Регенеранты либо вообще не зацветали, либо имели высокий процент стерильной пыльцы.

Большинство соматоклональных изменений было получено при регенерации растений из длительно культивируемых каллусных клонов картофеля (Гостимский С.А. и др., 1988; Hussey H., Gunn H.V., 1984; Тихвинская Н.С, 1988; Ляпкина Н.С, 1990; Аш О.А. и др., 2003; Багрова А.М. и др., 1988, 1991). Длительно пассируемые каллусные культуры представляют специфическую биологическую популяцию, которая является источником дополнительного исходного материала в селекционной практике. Поэтому, изучение возможностей получения длительно пассируемых каллусных тканей и регенерации из них растений представляет значительный интерес. Впервые возможность получения длительно культивируемых (три года) каллусных культур картофеля, сохраняющих способность к регенерации побегов, была показана G.Hussey, H.V. Gunn (1984). Наиболее детально вопросы соматоклональной изменчивости, возникающей в длительно пассируемых каллусах картофеля, были изучены группой исследователей под руководством С.А. Гостимского (1985, 1987). Ими же была показана возможность получения растений-регенерантов из каллусов, культивируемых *in vitro* более 10 лет (Аш О.А. и др., 2003). Общая закономерность этих работ - отсутствие индукции ризогенеза у регенерантных побегов. Полученные регенерантные побеги выращивали с помощью прививок на контрольных растениях в теплице.

Возможности использования соматоклональных вариантов картофеля в практической селекции изучены явно недостаточно. Имеется всего несколько сообщений о получении форм картофеля, толерантных к гербицидам (Ежова Т.А. и др., 1989, 1990а, 1990б; Ляпкина Н.С., 1990;).

Таким образом, в последние годы достигнут прогресс в регенерации растений из культивируемых *in vitro* тканей картофеля, Однако регенерация растений картофеля *in vitro* остается достаточно затрудненной и зависит от генотипа, исходного экспланта, времени культивирования, состава питательных сред и др. При этом многообразие сочетаний и взаимодействий этих факторов затрудняют сравнение между собой результатов опубликованных работ. До сих пор не существует единых, эффективных, легко воспроизводимых методик регенерации. Некоторые этапы регенерации, такие как индукция ризогенеза, проработаны слабо или вообще отсутствуют.

2 МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментальные исследования проводились в лаборатории микробиологии и биотехнологии Инновационного Евразийского университета в 2008-2009 годах.

2.1 Исходный материал

КАРТОФЕЛЬ (*Solanum tuberosum*) называемый также чилийским картофелем или картофель клубненосный. Родина его — Средний Чили и прилегающие острова (включая остров Чилоэ). Этот вид получил очень широкое распространение в странах с умеренным климатом. Местное население горных районов Южной Америки выращивает также и некоторые другие виды. Все виды картофеля относятся к секции туберариум (*Tuberarium*) рода паслен, насчитывающей вместе с дикими клубненосными видами около 200 видов, произрастающих преимущественно в Южной и Центральной Америке. Культурные виды картофеля размножаются клубнями (в селекционной работе также семенами). Введение картофеля в культуру (сначала путем эксплуатации диких зарослей) началось примерно 14 тыс. лет назад индейцами Южной Америки. В Европу (Испанию) картофель впервые был ввезен около 1565 г., откуда распространился по другим странам. В Россию картофель впервые попал в XVII в., но начало широкой культуре картофеля положил указ Сената в 1765 г. и завоз из-за границы партии семенного картофеля, разосланного по стране, из Центральной и Южной Америки, где он был введен в культуру коренными жителями задолго до нашей эры. В Западную Европу был ввезен Колумбом в XVI веке. Поначалу картофель выращивали в лучших ботанических садах Италии и Испании и в некоторых частных коллекциях из-за изысканной красоты его цветка. В XVII веке заморский овощ начал проникать в европейскую кухню. Считается, что первыми распробовали вкус картофеля англичане и ирландцы: ирландским беднякам картофель в значительной мере заменял хлеб, особенно в неурожайные годы. В Россию картофель попал из Голландии.

Считается, что сам Петр I, посетивший эту страну в конце XVII века, послал первый мешок клубней на родину. Но главная заслуга в популяризации картофеля в стране принадлежит Екатерине Великой. По ее распоряжению ученые составили подробнейшие инструкции по выращиванию картофельных клубней, их употреблению в пищу и на корм скоту и хранению. Население России встретило новую культуру с недоверием. Ярыми противниками картофеля в России были старообрядцы. Они называли картофель «чертовым яблоком» и считали великим грехом не только есть его клубни, но и выращивать их на своих огородах. На этой почве не раз возникали крестьянские волнения, получившие название картофельных бунтов. Однако большинство народа примирилось с неизбежным и принялось за дело. Уже к концу XVIII века посадки картофеля были широко распространены в северо-западных губерниях России и в Прибалтике. Новая культура прижилась и вскоре начала свое победное

шествие по стране. К концу XIX века картофель стал обычной огородной культурой повсеместно. В наши дни это - одна из основных культур промышленного и индивидуального выращивания, «второй хлеб» России.

Картофель легко приспосабливается к различным почвенным и климатическим условиям. Но чтобы получить устойчивые и высокие урожаи, надо умело выбрать сорт, наиболее подходящий для той местности, где расположен ваш участок. Сорта картофеля отличаются по скороспелости, урожайности, содержанию крахмала, вкусовым качествам клубней, их устойчивости к болезням и длительному хранению. Полезно знать, что ранние сорта меньше поражаются фитофторозом, чем среднепоздний и поздний картофель. Чтобы уберечь посадки, их необходимо несколько раз опрыскать во время роста микродозами меди. Под ранние сорта (Домодедовский, Воротынский, Белорусский ранний) не бойтесь вносить побольше органических удобрений, им перекорм не так вреден, как вреден он для позднего картофеля. Если нет скороспелых сортов, при умелом возделывании можно получить молодой картофель и от таких среднеспелых сортов, как Огонек, Гатчинский, и даже поздних Лорх и Темп. Если семенные клубни за месяц до высадки в грунт прогреть и прорастить на свету, то они быстрее дадут всходы. Перед посадкой в лунки их полезно опудрить древесной золой (1 кг золы на 50 кг клубней). Как появятся всходы, провести окучивание. Оно защитит ранние посадки от возвратных заморозков. Подкормки хороши лишь ранние, они благоприятно действуют на формирование клубней, их легкость и вкус. Поздние подкормки окажут обратное действие. Окучивания, рыхления, прополка сорняков, при необходимости полив – все это создает хорошие условия для сбора большого урожая.

Сорта картофеля исчисляются сотнями. Они отличаются по скороспелости, урожайности, содержанию крахмала, вкусовым качествам и внешнему виду клубней, их устойчивости к болезням и способности к длительному хранению. Чтобы получать стабильные и высокие урожаи, надо также учитывать устойчивость сорта к распространенным в вашем регионе заболеваниям картофеля. При выборе сорта следует учитывать, для чего вы планируете использовать картофель: приготовление блюд, переработка на чипсы, крахмал, сухой картофель, спирт, замораживание или хранение в виде клубней. Если для хранения, то следует выбирать сорта с хорошей легкостью. Это, как правило, сорта со средним и среднепоздним сроком созревания, срок вегетации у которых составляет в среднем 110-115 дней. У таких сортов и урожайность выше, и вкусовые качества клубней лучше за счет более высокого процента содержащегося в них крахмала. Рекомендуется также выбирать сорта картофеля с разной окраской клубней: с белой, розовой, красной кожурой. Было подмечено, что есть годы, в которые лучше родится картофель с красной кожурой, а урожай белого намного ниже. В другой год бывает наоборот. Случается и так, что в один год выше урожай раннего картофеля, а у средних сортов он ниже. На следующий год картина меняется.

Причина – в несовпадении погодных условий, наличии или отсутствии дождей. Сорта могут значительно отличаться по урожайности в зависимости от климатических условий не только года, но и района выращивания. Поэтому, сажая в один год несколько сортов, вы всегда будете с гарантированным урожаем..

УДАЧА - раннеспелый 70-80 дней. Популярный высокоурожайный столовый сорт, пригодный как для летнего, так и зимнего потребления. Клубни овальные, белые, с высокими вкусовыми качествами. Масса товарного клубня 90-120г. Всходы дружные и мощные: товарный урожай можно получить уже в июне при посадке пророщенными клубнями. Сорт устойчив к фитофторозу и черной ножке, среднеустойчив к поражению колорадским жуком.

ПУШКИНЕЦ - раннеспелый 70-80 дней. Столовый урожайный сорт с клубнями овальной формы, белого цвета, хорошего вкуса. Масса товарного клубня 100-130г. Устойчив к картофельной нематоде, среднеустойчив к фитофторозу, ризоктониозу, парше обыкновенной, черной ножке. Ценится за раннеспелость, стабильную урожайность и сравнительную нематодоустойчивость.

САНТЭ - среднеранний 80-90 дней. Высокоурожайный голландский сорт универсального использования. Клубни крупные, овальной формы с желтой кожурой и светло-желтой мякотью, хорошего вкуса. Обладает хорошей товарностью и легкостью. Пригоден к переработке на картофель фри. Устойчив к картофельной нематоде, фитофторозу, вирусам, среднеустойчив к парше обыкновенной, восприимчив к ризоктониозу.

КОНДОР - среднеранний 80-90 дней. Столовый высокоурожайный голландский сорт с высокой товарностью. Клубни крупные, удлинено-овальной формы, с красной кожурой и светло-желтой мякотью. Хорошо хранятся и обладают отличными вкусовыми качествами. Масса товарного клубня 90-180г. Сорт устойчив к вирусным болезням и парше обыкновенной, восприимчив к фитофторозу.

РОМАНО - среднеранний 80-90 дней (рис. 1). Столовый голландский сорт с высокой товарностью, пользующийся растущей популярностью. Клубни округло-овальной правильной формы, кожура розовая, крепкая, не повреждается при уборке, мякоть светло-кремовая, вкус хороший. Масса товарного клубня 70-80г. Ботва развивается быстро, хорошо переносит засуху. Сорт среднеустойчив к фитофторозу, ризоктониозу. Восприимчив к парше обыкновенной.



Рис. 1 Романо

СКАЗКА - среднеранний 80-90 дней. Высокоурожайный сорт с хорошей товарностью. Клубни овальные, кожура желтая, мякоть белая, легкость хорошая. Масса товарного клубня 76-129г. Сорт отличается многоклубневостью: может давать до 30 и более картофелин с куста. Устойчив к фитофторозу, восприимчив к нематоду.

ЛУГОВСКОЙ - среднеспелый 90-110 дней. Столовый высокоурожайный сорт с высокой товарностью и хорошими вкусовыми качествами клубней. Клубни овальной формы, кожура светло-розовая, мякоть белая, легкость хорошая. Масса товарного клубня 85-125г. Сорт устойчив к фитофторозу, парше обыкновенной, среднеустойчив к черной ножке.

АГРИЯ - среднепоздний 110-120 дней. Высокоурожайный голландский сорт универсального назначения, пригодный для промышленной переработки. Клубни удлинено-овальной формы, желтого цвета, с желтой мякотью. Легкость высокая. Масса товарного клубня 72-135г. Сорт обладает высокими вкусовыми качествами. Устойчив к картофельной нематоду, восприимчив к фитофторозу и парше обыкновенной.

ЖУКОВСКИЙ РАННИЙ - Раннеспелый 70-80 дней. Пластичный сорт, который дает высокие урожаи в различных почвенно-климатических условиях. При посадке в почву клубни активно прорастают, даже при низкой температуре. Клубни с розовой окраской, выровненные, хранятся долго. Один из лучших сортов по вкусовым качествам. Засухоустойчив. Устойчив к парше, картофельной нематоду и ризоктониозу.

ВЕСНА БЕЛАЯ – Раннеспелый 70-80 дней. Столовый сорт с высокой товарностью. Клубни белые, овальные, для хозяйственных нужд появляются через 55-60 дней (лежкими становятся через 70-80 дней),хорошего вкуса. Масса товарного клубня 100-185г. Лежкость хорошая (но главным образом используется как свежий ранний картофель). Среднеустойчив к ризоктониозу и парше обыкновенной, восприимчив к фитофторозу.

ТИМО ХАНККИЯН — Раннеспелый 70-80 дней. Сорт из Финляндии, столовый, урожайный, пригоден для выращивания на всех типах почв.

Клубни белые, округлые, хорошего вкуса хранятся долго. Масса товарного клубня 65-120г. Всходы дружные и мощные. Сорт устойчив к повышенным температурам, засухе и переувлажнению. Устойчив к ризоктониозу, черной ножке, парше, среднеустойчив к фитофторозу.

Белоснежка Сорт селекции ВНИИКХ, среднеранний, столовый. Клубни округлые, белые, с белой мякотью. Глазки поверхностные. Масса клубня 90г. Урожайность до 400кг с сотки. Крахмалистый, вкусный, высокая развариваемость клубней. Относительно устойчив к фитофторозу и другим заболеваниям.

Химический состав клубней зависит от сорта, условий выращивания (климатических, погодных, типа почвы, применяемых удобрений, агротехники возделывания), зрелости клубней, сроков и условий хранения и др. В среднем картофель содержит (в %): воды 75 %; крахмала 18,2; азотистых веществ (сырой протеин) 2; сахаров 1,5; клетчатки 1; жиров 0,1; титруемых кислот 0,2; веществ фенольной природы 0,1; пектиновых веществ 0,6; прочих органических соединений (нуклеиновых кислот, гликоалкалоидов, гемицеллюлоз и др.) 1,6; минеральных веществ 1,1. Ориентировочно различают сорта картофеля с высоким содержанием сухих веществ (более 25 %), средним (22—25 %) и низким (менее 22 %). Крахмал составляет 70—80 % всех сухих веществ клубня; находится он в клетках в виде слоистых крахмальных зёрен размером от 1 до 100 мкм, но чаще 20—40 мкм. Содержание крахмала зависит от скороспелости сортов: оно выше у позднеспелых. В процессе хранения количество крахмала в клубнях уменьшается в результате гидролитического распада его до сахаров. В большей мере снижается содержание [крахмала](#) при низкой температуре (1—2°С). Сахара в картофеле представлены глюкозой (около 65 % к общему сахару), фруктозой (5 %) и сахарозой (30 %), в незначительном количестве встречается мальтоза, обычно при прорастании картофеля. Наряду со свободными сахарами в картофеле имеются фосфорные эфиры сахаров (глюкозо-1-фосфат, фруктозо-6-фосфат и др.).

Клубни содержат в среднем

1. [воды](#) — 76,3 %
2. сухого вещества — 23,7 %, в том числе
3. [крахмала](#) — 17,5 %
4. [сахаров](#) — 0,5 %
5. [белка](#) — 1-2 %
6. минеральных солей — около 1 %

Максимальное содержание сухого вещества в клубнях 36,8 %, [крахмала](#) 29,4 %, [белка](#) 4,6 %, витаминов [С](#), [В1](#), [В2](#), [В6](#), [РР](#), [К](#) и [каротиноидов](#).



Рис. 2 *Solanum tuberosum*

Клубень картофеля (рис. 2) (*Solanum tuberosum*) с развивающимися из пазушных почек молодыми боковыми побегами — модифицированный подземный [побег](#) растения, утолщённый и с [редуцированными листьями](#). Клубни развиваются, как правило, на концах [столонов](#) — боковых побегов [корневища](#). Как и на большинстве вегетативных побегов, на клубне можно обнаружить [пазушные почки](#) (у картофеля их обычно называют «глазки»). Клубни содержат богатые запасы питательных веществ, в основном, крахмала.

В зрелом картофеле [сахаров](#) немного (0,5—1,5 %), но они могут накапливаться (до 6 % и более) или исчезать полностью, что наблюдается при длительном хранении. Решающим фактором при этом является температура. Биологической основой изменения содержания сахароз служит различная скорость одновременно протекающих в клубнях трёх основных процессов углеводного обмена: осахаривания крахмала, синтеза крахмала из сахаров и окислительного распада сахаров при дыхании. Эти процессы регулируются соответствующими [ферментными](#) системами. Установлено, что при температуре 10 °С в 1 кг клубней образуется 35,8 мг сахара и столько же расходуется, при меньшей температуре (0-10°С) — наблюдается накопление сахара в клубне (по достижении определённого уровня содержание сахаров остаётся постоянным), а при температуре большей 10 °С сахар больше расходуется, чем образуется. Таким образом, накопление сахара можно регулировать, изменяя температуру хранения. Накопление сахаров в клубнях во время хранения значительно зависит и от сорта картофеля.

Повышение содержания сахаров более чем на 1,5—2 % отрицательно сказывается на качестве картофеля (при варке он темнеет за счёт образования

меланоидинов, приобретает сладкий вкус и др.). Сырой клетчатки в клубне содержится около 1 %, примерно столько же и гемицеллюлоз, главным образом пентозанов, составляющих вместе с клетчаткой основную массу клеточных стенок. Наибольшее количество клетчатки и пентозанов находится в перидерме, значительно меньше их в коре и ещё меньше в зоне сосудистых пучков и сердцевине. [Пектиновые](#) вещества являются полимерными соединениями с большой молекулярной массой. Они построены из остатков галактуроновой кислоты, являющейся продуктом окисления глюкозы. Среднее содержание пектиновых веществ в картофеле составляет 0,7 %. Эти вещества неоднородны и встречаются в виде [протопектина](#), пектина, пектиновой и пектовой кислот. Последние три соединения обычно называют пектинами (пектином). Протопектин нерастворим в воде и находится в связанном состоянии, образуя межклеточную прослойку в растительных тканях. Он служит как бы цементирующим материалом для клеток, обуславливая твёрдость тканей.

Существует мнение, что протопектин состоит из молекул пектиновых кислот, цепочки которых связаны между собой через [ионы](#) кальция, магния и фосфорнокислые «мостики»; при этом молекула протопектина может образовывать комплексы с целлюлозой и [гемицеллюлозами](#). Под действием ферментов, при кипячении в воде, нагревании с разбавленными кислотами и щелочами происходят гидролиз протопектина с образованием растворимого в воде пектина. Этим объясняется размягчение картофеля в процессе варки. Пектин является сложным [эфиром](#) метилового спирта и пектиновой кислоты. Молекулы пектиновой кислоты содержат мало метоксильных групп, а молекулы пектовой кислоты не содержат их вовсе. Все эти соединения растворимы в воде, находятся в клеточном соке. Пектиновые вещества, обладая большой [гидрофильностью](#), способностью к набуханию и коллоидным характером растворов, играют важную роль в качестве регуляторов водного обмена в растениях, а в продуктах — в формировании их структуры. Азотистые вещества в картофеле составляют 1,5—2,5 %, из них значительная часть — белки. Белкового азота в целом в 1,5—2,5 раза больше, чем небелкового. Среди небелковых веществ в заметных количествах содержатся свободные аминокислоты и амиды. Незначительная часть азота представлена в нуклеиновых кислотах, некоторых [гликозидах](#), витаминах группы В, в виде [аммиака](#) и [нитратов](#). Основным белком картофеля — туберин — является глобулином (55—77 % всех белков); на долю глутаминов приходится 20—40 %.

По биологической ценности белки картофеля превосходят белки многих [зерновых](#) культур и мало уступают белкам мяса и яйца. Полноценность белков определяется составом аминокислот и, в частности, соотношением незаменимых аминокислот. В картофельном белке и в составе свободных аминокислот картофеля содержатся все аминокислоты, встречающиеся в растениях, в том числе в удачном соотношении незаменимые: [лизин](#), [метионин](#), [треонин](#), [триптофан](#), [валин](#), [фенилаланин](#), [лейцин](#), [изолейцин](#).

Из [амидов](#) в клубнях содержатся [аспарагин](#) и [глутамин](#); среди азотсодержащих [гликозидов](#) — [соланин](#), [чаконин](#) и [скополетин](#), обуславливающие [горечь](#) кожицы, иногда и мякоти, сосредоточенные в основном в покровных тканях и верхних слоях клубня. Содержание [гликоалкалоидов](#) ([соланина](#)) в картофеле около 10 мг %. Повышается при прорастании клубней и хранении на свету. Азотистые вещества распределены в клубне неравномерно: меньше в зоне сосудистых пучков, увеличиваясь в направлениях к поверхности клубня и внутрь.

Содержание белка наибольшее в коре и зоне сосудистых пучков и уменьшается к внутренней сердцевине, а небелкового азота, наоборот, больше всего во внутренней сердцевине и уменьшается к поверхности клубня. [Ферменты](#) представляют собой органические катализаторы, образующиеся в живых клетках в незначительных количествах в клубнях картофеля особое место занимают [гидролазы](#) — [амилаза](#) (α и β), [сахараза](#) ([инвертаза](#)); [оксидоредуктазы](#) — [полифенолоксидаза](#) ([тирозиназа](#)), [пероксидаза](#), [аскорбиназа](#), [каталаза](#) и др.; [эстеразы](#) — [фосфоорилаза](#) и др. [Амилаза](#) осуществляет [гидролиз](#) крахмала до мальтозы и [декстринов](#), [инвертаза](#) расщепляет сахарозу на глюкозу и фруктозу. [Полифенолоксидаза](#) окисляет фенольные соединения, а [пероксидаза](#), кроме того, и ароматические амины. [Каталаза](#) разлагает пероксид водорода на воду и кислород. [Оксидоредуктазы](#) играют важную роль в дыхании. Важной задачей при производстве картофелепродуктов является инактивация ферментов. В процессе технологической обработки разрушается наружный слой картофеля.

Создаются благоприятные условия для взаимодействия легкоокисляющихся веществ ([полифенолов](#)) с кислородом воздуха при катализирующем действии окислительных ферментов ([пероксидазы](#) и др.). В результате образуются тёмноокрашенные вещества — [меланины](#), которые ухудшают внешний вид и другие качества продуктов. Предотвращение ферментативных реакций достигается рядом мер: термической обработкой, в результате которой белковый носитель свёртывается, что приводит к инактивации ферментов; применением веществ (ингибиторов), образующих комплексы с хинонами перед их полимеризацией; связыванием ионов тяжёлых металлов. В качестве ингибиторов ферментативных реакций наиболее часто применяются сернистые соединения, [аскорбиновая кислота](#), [лимонная кислота](#) и другие. Витамины обуславливают биологическую ценность картофеля как пищевого продукта. В клубнях картофеля в среднем содержится (в мг на 100г): витамина С 12; РР 0,57; В1 0,11; В2 0,66; В6 0,22; пантотеновой кислоты 0,32; каротина (провитамина А) следы; инозита 29.

В незначительных количествах обнаружены биотин (витамин Н) и витамины Е, К и др. Органические кислоты обуславливают кислотность клеточного сока картофеля. Значение [рН](#) для картофеля установлено в пределах 5,6—6,2. Картофель содержит лимонную, яблочную, шавелевую, изолимонную, молочную, пировиноградную, винную, хлорогеновую, хинную и другие органические кислоты. Наиболее богат картофель лимонной кислотой. При переработке на крахмал 1 т картофеля дополнительно получают не менее 1 кг лимонной кислоты. Из минеральных кислот в

клубнях преобладает фосфорная, по содержанию которой можно судить о накоплении [фосфора](#). [Жиры](#) и [липиды](#) в картофеле составляют в среднем 0,10—0,15 % сырой массы. В жирах обнаружены пальмитиновая, миристиновая, линолевая и [линоленовая кислоты](#). Две последние имеют важное пищевое значение, так как они не синтезируются в организме животных. Большое значение имеет картофель как источник минеральных веществ. В картофеле они в основном представлены солями калия и фосфора; имеются также [натрий](#), кальций, магний, железо, сера, хлор и [микроэлементы](#) — цинк, бром, кремний, медь, бор, марганец, йод, кобальт и др. Общее содержание золы в клубне около 1 %, в том числе (в мг%): [K₂O](#) — около 600, P — 60, — 21, Mg— 23, Ca —10. Распределены минеральные вещества в клубне неравномерно: больше всего их в коре, меньше — в наружной сердцевине, в верхушечной части больше, чем в основании. Минеральные элементы в клубне в основном находятся в легкоусвояемой форме и представлены щелочными солями, которые содействуют поддержанию щелочного равновесия в крови. Из красящих веществ в клубнях содержатся каротиноиды: 0,14 мг% в клубнях с жёлтой мякотью и около 0,02 мг% в клубнях с белой мякотью. В кожице найдены также флавоны, флавононы и антоцианы (цианидин, дельфинидин).

В нормальном суточном рационе человека в зависимости от занятий и затрат энергии калорийность пищи должна составлять около 3000 ккал (12 552 кДж). Для получения 100 ккал (418,4 кДж) организм должен получить с пищей 107—120г картофеля или 300г моркови, 500г капусты, 650г томатов, 1000г огурцов. Один килограмм картофеля может дать 940 ккал (3933 кДж). Потребление 300г картофеля обеспечивает получение организмом более 10% энергии, почти полную норму витамина С, около 50% калия, 10% фосфора, 15% железа, 3% кальция.

2.2 Методика проведения исследований

За основу при работе с культурой тканей картофеля была принята методика, предложенная Р.Г. Бутенко (1964). Все манипуляции с культурами тканей проводили в стерильных условиях.

В качестве первичных эксплантов использовали верхушки или асептических проростков картофеля. Проростки стерилизовали следующим образом:

- стерилизация хромовой смесью (55% раствор бихромата калия вконцентрированной серной кислоте) - 1 мин;
- промывка стерильной дистиллированной водой;
- стерилизация в 96% этаноле — 10 мин;
- промывка стерильной дистиллированной водой;
- стерилизация в 0,6% водном растворе хлоргексидиндиглюконата натрия - 5 мин; пятикратная промывка стерильной дистиллированной водой.

Стерильные проростки выдерживали в термостате, при температуре 26° С, относительной влажности воздуха не ниже 70%, на двух слоях влажной

стерильной фильтровальной бумаги в чашках Петри по 5-10 семян. Время проращивания 3-5 суток.

Для инициации каллусогенеза первичные экспланты измельчали скальпелем и помещали на поверхность агаризованных питательных сред.

В качестве питательных сред использовали среды с минеральной основой MS (Murashige T., Skoog F., 1962) или B5 (Gamborg OX. et al., 1968) (табл. 1). В качестве регуляторов роста использовали: 6-бензиламинопурин (БАП), индол ил-3-уксусную кислоту (ИУК), омитфтилуксусную кислоту (НУК), индолил-3-масляную кислоту (ИМК). Концентрации и соотношение регуляторов роста в питательных средах приведены в процессе обсуждения результатов.

Среды стерилизовали путем автоклавирования в течение 30 мин. при температуре 120°C. Все культуры выращивали на свету при температуре 25°C, 16-часовом фотопериоде.

Учитывали следующие показатели, характеризующие процессы регенерации:

- способность к каллусообразованию (процент образовавшихся каллусов, интенсивность каллусогенеза, морфологию каллусов);
- способность к побегообразованию (число образовавшихся побегов на каллус);
- выживаемость каллусных клонов при длительном культивировании *in vitro*;
- морфогенную активность длительно культивируемых каллусных тканей (число регенерантных побегов на каллус);
- индукцию ризогенеза (процент побегов с корнями).

Таблица №1 – Состав питательных сред для культивирования изолированных тканей

Компоненты питательной среды	Концентрация, мг/л	
	Мурашиге-Скуга	Гамборга В 5
NH ₄ NO ₃	1650	-
KN ₀ ₃	1900	2500
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	150
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	250
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134
KH ₂ PO ₄	170	-
Ka ₂ ЭДТА2H ₂ O	37,3	-
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8	28
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	-	150

Продолжение таблицы №1

H ₃ BO ₃	6,2	3,0
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	22,3	-
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6	2,0
KJ	0,83	0,75 .
MnSO ₄ H ₂ O	-	10,0
Na ₂ MoO ₄ - 2H ₂ O	0,25	0,25
CuSO ₄ - 5H ₂ O	0,025	0,025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025	0,025
Глицин	2,0	-
Мезоинозит	100	100
Никотиновая кислота	0,5	1,0
Пиридоксин	0,5	1,0
Тиамин	0,1	10,0
Сахароза	30000	30000
Агар	6000	6000
pH	5,8-6,0	5,8-6,

Интенсивность каллусогенеза определяли отношением массы каллусов после одного пассажа к массе исходных эксплантов.

Сформировавшиеся в ходе эксперимента корнесобственные регенерантные растения R₀ извлекали из пробирок, отмывали от агаризованной среды и на сутки помещали в стаканчики с водой, с целью адаптации к условиям пониженной влажности воздуха. Затем растения высаживали в вегетационные сосуды с почвой и выращивали в домашних условиях.

3 ИНДУКЦИЯ ПРОЦЕССОВ КАЛЛУСОГЕНЕЗА И МОРФОГЕНЕЗА В КАЛЛУСНЫХ ТКАНЯХ КАРТОФЕЛЯ

3.1 Индукция процессов дедифференциации и каллусогенеза

Несмотря на то, что картофель впервые введен в культуру *in vitro* достаточно давно и в настоящее время имеется большое количество методик регенерации, но общепринятых, воспроизводимых методов, все еще нет.

Анализ литературы показал, что эффективность индукции каллусогенеза зависит от ряда факторов: исходного генотипа, тканевой принадлежности первичных эксплантов, минеральной основы питательных сред и комбинации гормонов. По мнению Н.-I. Jacobsen (1980), более предпочтительной для индукции каллусогенеза является среда Гамборга В5. Было установлено, что превышение концентрации ауксинов над цитокининами в питательной среде в два и более раза вызывает существенное увеличение выхода каллуса. Большинство исследователей предлагают для индукции каллусогенеза использовать комбинации, включающие БАП, НУК или ИМК в различных концентрациях (Rubluo A. et al., 1982; Malmberg R.L., 1979; Russel L. et al., 1979; Herlt M. et al., 1978; Кострубин М.М. и др., 1992; Ежова Т.А. и др., 1985).

Многообразие сочетаний регуляторов роста и варьирования концентраций делают результаты опубликованных работ трудно сравнимыми между собой. Более того, предложенные регенерационные методики разработаны на различных сортах картофеля, а поэтому не всегда пригодны для работ с другими генотипами. В связи с противоречивостью литературных данных возникла необходимость проведения сравнительного анализа наиболее часто используемых питательных сред для идентификации оптимальной среды для индукции каллусогенеза у картофеля. Поэтому, нами изучалась индукция каллусогенеза у картофеля с использованием шести вариантов питательных сред, дающих наибольший эффект (таб. 2).

Рост ряда культивируемых тканей стимулируется введением в состав сред отдельных аминокислот. Поэтому, для повышения результативности

- инициации каллусогенеза у картофеля использовали гидролизат казеина.

Таблица №2 Состав питательных сред для индукции каллусогенеза у картофеля

Компоненты среды, мг/л	КГ ₁	КГ ₂	КГ ₃	КГ ₄	КГ ₅	КГ ₆
Минеральная основа	В5	В5	В5	В5	В5	В5
Сахароза	30000	30000	30000	30000	30000	30000
Никотиновая кислота	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Пиридоксин	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Продолжение таблицы № 2

Гидролизат казеина	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Тиамин	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Мезоинозит	100	100	100	100	100	100
Агар	6000	6000	6000	6000	6000	6000
NH ₄ NO ₃	10	10	10	-	5	-
БАП	1	1,0	0,66	0,1	-	-
НУК	0,2	2,0	5,0	'-	-	-
ИМК	-	-	-	1,0	1,0	1,5

После посадки на питательные среды часть первичных эксплантов была инфицирована. Около 20% эксплантов, тронувшихся в рост, через некоторое время прекращали рост, бурели и некротизировались. Большая часть первичных эксплантов образовали каллусную ткань. Как правило, первичные каллусы возникали на раневых поверхностях экспланта. В некоторых случаях каллусообразование наблюдалось за счет равномерного разрыхления всего экспланта. Интенсивность роста первичного каллуса во многих случаях была высокой. Через 5-7 суток после изолирования визуально обнаруживали на эксплантах новообразования. С течением времени каллус разрастался и примерно через месяц после посадки эксплантов на питательные среды они покрывались сплошной каллусной тканью. Интенсивность каллусообразования приведена в таблице 3.

Установили, что на всех средах удалось индуцировать каллусогенез картофеля, независимо от происхождения первичного экспланта и присутствия тех или иных регуляторов роста. Между сортами были обнаружены незначительные различия по интенсивности каллусогенеза.

На инициацию каллусогенеза картофеля заметное влияние оказывали состав и концентрация регуляторов роста, а также происхождение соматических тканей, являющихся источниками получения каллусов. Интенсивность процессов каллусообразования из верхушек побегов оказалась на порядок выше, чем из семядольных узлов. Каллусы, сформированные из верхушек побегов, увеличивали первоначальный вес в 20-30 раз, в то время как масса каллусов, происходящих из семядольных узлов, увеличилась лишь в 4-5 раз. Реакция эксплантов на регуляторы роста в питательной среде была неоднозначна. Более активное нарастание каллусной ткани отмечено на средах с ИМК. Очень близкие результаты получены на среде КГ₃ в присутствии НУК в достаточно большой концентрации - 5,0 мг/л. На средах КГ₁ и КГ₂ с невысокой концентрацией НУК (0,2 и 2,0 мг/л соответственно) процессы каллусообразования протекали менее интенсивно. Через 3-4 недели культивирования первичных эксплантов на каллусогенных средах отмечали формирование каллусов трех типов, хорошо различающихся визуально:

- тип «А» - плотный, компактный, более или менее однородный, с беловатой бархатистой поверхностью, с вкраплением зеленых меристематических участков, (рис. 3);

- тип «В» - рыхлый, глобулярный, светло-зеленый, отличающийся более высокой скоростью роста, (рис. 4);

- тип «С» - рыхлый, оводненный светлый, на свету не зеленеющий. Образовывался крайне редко.

Тип образующегося каллуса зависел от тканевой принадлежности исходных эксплантов. Чаще всего каллус типа «А» формировался при использовании в качестве первичных эксплантов семядольных узлов. Каллус типа «В», зеленый, рыхлый в виде мха обычно формировался из апикальных частей проростков

.*

Таблица № 3 Интенсивность каллусогенеза у картофеля в зависимости от типа первичных эксплантов и состава питательных сред

Среда	Романо						Сказка					
	семядольный узел			верхушка побега			семядольный узел			верхушка побега		
	W ₀	W _t	AW/W ₀	W ₀	W _t	AW/W ₀	W ₀	W _t	AW/W ₀	W ₀	W _t	AW/W ₀
КГ₃	49,6± 4,0	251,1± 20,1	4,06	15,5± 0,9	333,0± 20,1	20,5	41,0± 3,4	239,0± 20,1	4,82	16,7± 1,2	400,2± 29,3	22,9
КГ ₃	39,6± 3,2	253,1± 20,4	5,39	15,0± 1,0	351,5± 22,7	22,4	41,1± 3,4	241,1± 19,8	4,86	15,1± 1,1	481,4± 36,1	30,9
КГ ₄	44,9± 3,8	264,1± 22,2	4,88	16,0±	354,1± 24,3	21,1	48,1± 3,7	265,2± 20,3	4,51	16,2±	452,1± 31,4	26,9
КГ ₅	45,7± 3,7	215,5± 17,4	4,74	15,4± 1,2	324,8± 27,3	20,1	45,9± 3,1	256,7± 10,6	4,59	15,0± 0,9	451,8± 34,0	29,1
КГ₆	44,2± 3,4	258,8± 19,8	4,85	14,7± 1,0	420,6± 28,4	27,6	45,6± 3,6	283,0± 22,2	5,21	15,2± 1,0	456Д± 32,8	29,0

Примечание: W₀ - начальный вес каллуса, мг W_t-
конечный вес каллуса, мг AW - прирост
каллуса, мг AW/W₀—относительный
прирост каллус

Формирование каллусов типов «А» и «В» на средах с НУК наблюдалось как у сорта Романо, так и у сорта Сказка. На питательных средах с ИМК образование каллуса типа «А» у изученных сортов наблюдали крайне редко.

На средах в присутствии ИМК наряду с каллусообразованием у изученных сортов нередко наблюдали формирование корней. В результате рост каллусной ткани замедлялся, шло развитие корневой системы. На средах, содержащих НУК в качестве регуляторов роста, подобных образований не наблюдалось.

Каллусы картофеля культивировали на каллусогенных питательных средах в течение 6-8 недель. В дальнейшем каллусы пассировали на специальные среды для индукции морфогенеза или на свежие среды того же состава. Таким образом, оптимальной средой для индукции каллусогенеза у изученных сортов картофеля является питательная среда КГз (0,66 мг/л БАП + 5,0 мг/л НУК).



Рис. 3 Каллус картофеля тип «А»

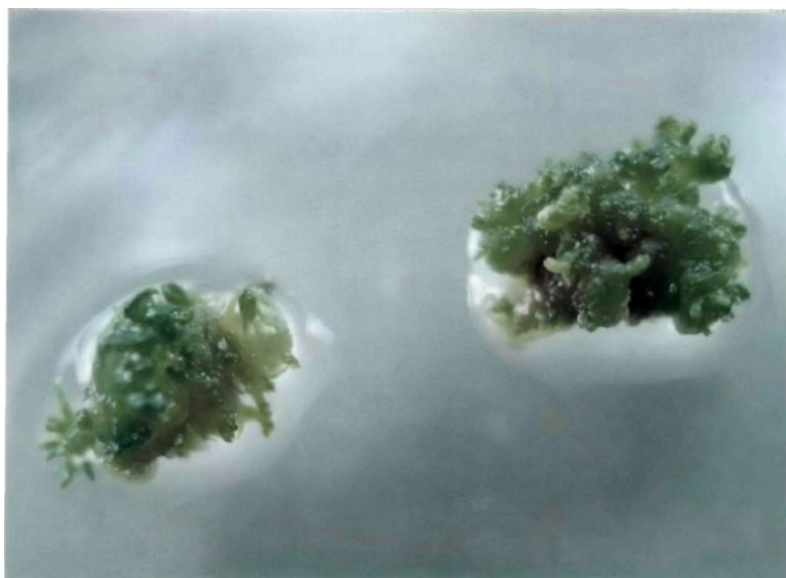


Рис. 4 Каллус картофеля тип «В»

3.2 Индукция процессов морфогенеза в каллусной ткани картофеля

Возможности использования культуры каллусов связаны, прежде всего, с разработкой простых и эффективных методов регенерации.

Побегообразование наиболее эффективно осуществляется при смещении ауксин-цитокенинового баланса среды в сторону относительного увеличения содержания цитокининов (Кострубин М.М. и др., 1992; Griga M., 1984; Ежова Т.А. и др., 1985, 1987).

С целью индуцирования морфогенеза в каллусных тканях картофеля изучалось несколько вариантов питательных сред с различным содержанием регуляторов роста (табл. 4).

В качестве основы питательных сред использовали состав минеральных солей среды Мурашиге и Скуга. Отличительной особенностью этой среды является высокая концентрация неорганического азота. При этом сочетание аммонийного и нитратного азота оптимально, как для процессов неорганизованного роста, так и для процессов органогенеза. Витамины в составе питательных сред активизируют процессы органогенеза, поэтому витаминная основа сред была взята по Гамборгу В5, где их содержание наиболее высокое.

После переноса сформировавшихся каллусов картофеля на культуральные среды, указанные в таблице 4, на поверхности каллусных тканей формировались меристематические очаги. Они возникали как на периферии каллусных тканей, так и внутри них. В результате, образовывались морфогенные структуры и формировались побеговые почки, из которых в дальнейшем часть развивалась в побеги нормальной морфологии, а другая часть оставалась в состоянии структур неопределенной морфологии.

Таблица №4 - Состав питательных сред для индукции морфогенеза в каллусных тканях картофеля

Компоненты среды, мг/л	Среда		
	MR4	MR ₂	MS _i
Минеральная основа	MS	MS	MS
Витамины	B5	B5	B5
Сахароза	30000	30000	30000
Инозитол	100	100	100
Агар	6000	6000	6000
ИУК	-	0,2	-
НУК	-	-	0,2
ИМК	0,25	-	-
БАП	1	5	5

Как видно из таблицы 5 способность каллусных тканей картофеля к морфогенезу побегов зависела от соотношения и концентраций регуляторов роста в составе регенерационных сред. Среда MR4 с низким содержанием БАП (1,0 мг/л), резко уступала другим средам по всем показателям: эффективности морфогенеза, числу побегов на каллус. Однако, как показали дальнейшие наблюдения, данная среда представляет несомненный интерес, так как является наиболее эффективной для дорацивания регенерантных побегов и служит промежуточным звеном между морфогенными и ризогенными регенерационными средами.

Таблица № 5 - Способность к морфогенезу каллусных тканей картофеля

Среда	РОМАНО			СКАЗКА		
	всего каллусов	эффективность морфогенеза, %	число побегов на каллус	всего каллусов	эффективность морфогенеза, %	число побегов на каллус
MR4	39	23,1	0,8±0,26	24	33,3	0,9±0,20
MR ₂	28	67,9	2,4±0,39	21	62,4	2,0±0,31
MSi	25	68,0	1,9±0,20	38	73,7	2,4±0,32

Что касается сред MR2 и MSi, то достоверных различий по числу

побегов на каллус между ними обнаружено не было. Это позволяет подтвердить данные о решающей роли цитокининов, в частности БАП, в индукции морфогенных процессов в каллусных тканях картофеля. Каллусные ткани на этих средах интенсивно зеленели и формировали множественные меристематические структуры (рис.5) При этом пассируемые клоны внешне напоминали куртинки мха.



Рис. 5 Морфогенная каллусная культура картофеля

Сортовых различий по способности к органогенезу между сортами Романо и Сказка нам обнаружить не удалось. Количество побегов, формирующихся на каждом морфогенном каллусе, колебалось от 1 до 3.

В наших исследованиях подтвердились выводы, сделанные ранее на картофеля и других культурах, о существовании корреляции между морфологией каллуса и его морфогенной способностью (Мурашко Л.Н., Фадеева Т.С, 1973). Плотный, компактный каллус тип «А» отличался пониженной морфогенной активностью. На морфогенных питательных средах наблюдались единичные случаи образования побегов. Вероятно, такой каллус не способен к морфогенезу или требует подбора иных питательных сред.

Морфогенный каллус, после декапитации регенерантных побегов переносили на свежие регенерационные среды того же состава, а побеги на ризогенные среды для укоренения.

3.3 Индукция процессов ризогенеза картофеля

Анализ литературы свидетельствует, что одним из наиболее сложных этапов культивирования изолированных тканей картофеля можно считать индукцию ризогенеза. В литературе до настоящего времени практически не описаны условия, необходимые для индукции ризогенеза у регенерантных побегов. Существует несколько подходов к решению вопросов ризогенеза. Наиболее привлекательным, по нашему мнению, является получение корнесобственных растений в условиях *in vitro* и перевод их в почву.

Для этих целей ряд исследователей считают более пригодными питательные среды, содержащие минеральные соли среды Мурашиге и Скуга (Hussey G., Gunn H.V., 1984). Однако, другие исследователи предпочитают использовать минеральную основу среды В 5 (Mroginski L.A., Kartha K.K., 1981; Gamborg O.L. et al., 1974).

В ряде работ было показано, что высокие концентрации минеральных солей ингибируют процессы ризогенеза у картофеля, поэтому в ризогенных питательных средах минеральный состав должен быть уменьшен в два раза (Jacobsen H.-I. et al., 1980; Mroginski L.A., Kartha K.K., 1981). В более поздних работах эти выводы были приняты за основополагающие.

К сожалению, большинство исследователей в своих работах не приводят данных об эффективности ризогенеза, или указывают, что она оставалась довольно низкой (Natali L., Cavallini A., 1987).

Поэтому, для повышения выхода регенерантных растений группой ученых под руководством С.А. Гостимского (1985, 1987) предложен другой путь - прививка регенерантных побегов.

В связи с противоречивостью литературных данных нами была поставлена задача: изучить эффективность процессов ризогенеза у регенерантных побегов, полученных в каллусной культуре.

Материалом для изучения процессов ризогенеза служили побеги, полученные из каллусных культур картофеля. Хорошо сформированные регенерантные побеги длиной 4-4,5 см. Срез проводился под углом 45° к оси побега. После этого регенерантные побеги переносились на ризогенные среды. С целью индукции процессов ризогенеза у регенерантных побегов картофеля изучалось несколько вариантов питательных сред.

Большинство исследователей в качестве регуляторов роста для индукции ризогенеза у картофеля используют НУК или ИМК в концентрации 1-2 мг/л. Следует отметить, что сведений о применении других ауксинов для регенерации картофеля нам практически не встречалось, хотя известно большое количество веществ, способных оказывать стимулирующее влияние на процессы корнеобразования. Исходя из этих предпосылок, мы и подходили к составлению питательных сред для индукции ризогенеза у картофеля. Составы питательных сред, наиболее пригодные для ризогенеза, приведены в таблице 6.

Таблица № 6 - Состав питательных сред для индукции ризогенеза у регенерантных побегов картофеля

Компоненты среды, мг/л	2Ri	3Ri	5Ri	-6Ri	7Ri
Макросоли	0,5 B5	0,5 B5	0,5 B5	B5	B5
Микросоли	0,5 B5	0,5 B5	0,5 B5	B5	B5
Витамины	0,5 B5	0,5 B5	B5	B5	B5
Сахароза	30000	30000	30000	30000	30000
Агар	6000	6000	6000	6000	6000
НУК	1,8	1	-	-	-
ИМК	-	-	1	1	1,5

Через 5-10 дней основание побега, погруженное в питательную среду, утолщалось, и намечались первые корешки. Через 2-3 недели культивирования побегов на ризогенных средах формировались первые корешки. Результаты ризогенеза приведены в таблице 7. Как видно из таблицы на всех изученных средах происходили процессы ризогенеза. При этом эффективность ризогенеза у изученных генотипов колебалась от 16,4% до 26,8%. Однако следует отметить существование некоторых различий по интенсивности ризогенеза. Наиболее четко они проявились на уровне генотипов картофеля. Более того, у регенерантных побегов сорта Сказка в среднем образовывалось большее количество корней.

Таблица № 7 - Индукция ризогенеза у регенерантных побегов картофеля

Среда	Романо			Сказка		
	число высаженных побегов	эффективность ризогенеза, %	число корней на побег	число высаженных побегов	эффективность ризогенеза, %	число корней на побег
2 Ri	28	22,1	3,1	24	19,9	4,5
3Ri	26	24,2	4,2	23	26,3	4,4
5Ri	22	23,1	24	25	21,6 -	4,8
6Ri	25	16,4	3,6	20	26,8	4,8
7Ri	21	20,3	2,7	24	18,7	1,5

Неплохие результаты получены на ризогенной среде 2Ri, содержащей в качестве регулятора роста НУК. Однако нередко на этих средах наблюдалось разрастание базальной части побега, погруженной в

питательную среду. Рост корней при этом приостанавливался, новых корней не образовывалось. Подобное явление отмечено и на среде 7Ri.

Важно отметить, что уменьшение в 2 раза концентрации макросолей и витаминов не оказывало решающего влияния на индукцию процессов корнеобразования.

Нами не было выявлено различий по эффективности ризогенеза между средами, содержащими в качестве индукторов ризогенеза НУК или ИМК. В частности, наиболее эффективно протекали процессы ризогенеза на средах 3Ri, 5Ri, 6Ri. Первая из них в качестве регулятора роста содержала НУК, а среды 5Ri и 6Ri содержали ИМК. В процессе индукции ризогенеза у регенерантных побегов мы наблюдали два основных типа развития корневой системы. У одного из них отмечалось явление доминирования «главного» корня. При интенсивном развитии одного-двух корней (максимальная длина корня составляла 3мм.), остальные образовавшиеся корни существенно отставали в росте, достигая всего 1-2мм. У другого типа наблюдалось формирование пучка корней примерно одинакового размера (2,5-3,5мм).

Наши наблюдения свидетельствуют о том, что эффективность ризогенеза в значительной степени (даже в большей, чем от регуляторов роста) зависела от физиологического состояния регенерантных побегов, у которых индуцировали ризогенез. Образование корней наблюдали только у хорошо сформированных, не переросших регенерантных побегов (длина 4-4,5мм). Период доращивания декапитированных от каллуса побегов не должен превышать 4 недель.

К концу культивирования регенерантных побегов на ризогенных средах и моменту их перевода в нестерильные условия длина корневой системы колебалась от 3-5 до 10-12 мм.

Отдельные клетки культивируют для получения клонов, изучения их генетической и физиологической изменчивости или стабильности. Кроме того, культивирование отдельных клеток позволяет изучать условия, определяющие возникновение стимулов к делению у клеток, изолированных от влияния других клеток популяции или ткани. Отдельные клетки также важны для клоновой селекции мутантных, гибридных и трансформированных линий. Обычно в такие клетки вводят маркерные гены, которые позволяют осуществлять селекцию.

Кроме того, отдельные клетки могут служить моделью для сравнительного изучения физиологических процессов в ткани и изолированной клетке. Например, для изучения фотодыхания можно сравнивать процесс фотосинтеза на уровне отдельных клеток мезофилла листа и целой ткани.

Выращивание изолированных клеток складывается из двух этапов:

1) изолирование неповрежденной клетки растительной или каллусной ткани;

2) создание условий, благоприятных для роста и развития изолированной клетки.

На первом этапе необходимо выделить неповрежденную и

жизнеспособную клетку из ткани целого растения или каллусной ткани. Этого можно достичь путем обработки ткани пектиназами, что ведет к мацерации ее клеток. Однако не всегда после такой обработки клетки сохраняют способность к последующим делениям и образованию ткани. Лучше получать отдельные клетки из суспензионных культур или рыхлого каллуса. Идеальными отдельными клетками являются протопласты, образовавшие клеточную стенку.

Далее клетки изолируют либо при помощи микроманипуляторов, либо путем ряда последовательных разведений. При первых же попытках культивирования отдельных клеток возникла важная научная проблема: как заставить делиться клетки, изолированные от влияния других клеток популяции или тканей? Отдельные клетки вели себя иначе, чем их скопления в виде агрегатов в суспензии или каллусной массы на поверхности питательной среды.

При ее решении возникла гипотеза о «факторе кондиционирования». Так было названо вещество, стимулирующее деление отдельных клеток. Определено, что этот фактор имеет химическую природу, термолабилен, водорастворим, низкомолекулярен (М.К. Павлова, Р.Г. Бутенко, 1965), видонеспецифичен, не заменяет известные фитогормоны, синергичен с брассиностероидами. Было предложено несколько вариантов культивирования отдельных клеток.

Впервые подобрать условия, подходящие для деления отдельных клеток, удалось в 1954 году Мьюиру, Хильденбранту и Райкеру. Этот способ получил название метода «ткани – няньки» (рис.6).

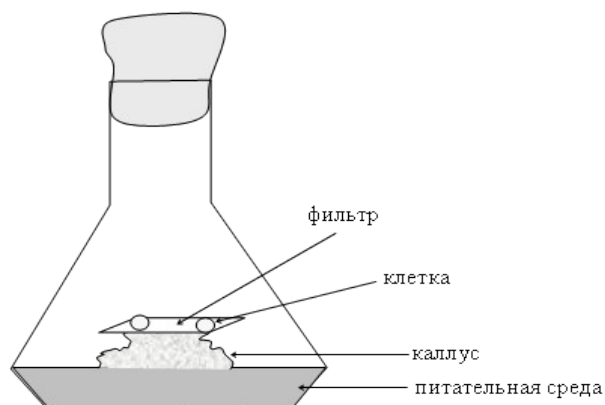


Рис. 6. Схема использования каллуса в качестве «ткани - няньки»

Клетку изолируют при помощи микроманипулятора из рыхлого каллуса непосредственно на кусочек фильтра размером 8 * 8 мм, помещенный на верхушку каллусной ткани, из которой была взята клетка. Каллус должен находиться в фазе активного роста. Можно также в качестве «няньки» использовать каллусную ткань другого растения родственного вида. В этом случае клетки растут и делятся. По мере старения каллуса – няньки фильтр с

клетками переносится на молодой каллус. Когда ткань из клетки достигает размеров 0,5 – 1 мм, то ее можно высаживать непосредственно на питательную среду.

Проводились также эксперименты по высаживанию клетки непосредственно на агаризованную среду, но обязательно рядом с фильтром, который в течение нескольких дней контактировал с молодой, интенсивно растущей каллусной тканью. Поскольку эти работы показали, что постоянный контакт клетки через фильтр с каллусной массой не является обязательным для деления клетки, то было предложено использовать старую культуральную среду для стимуляции одиночной клетки к делению.

Можно также использовать метод «кормящего слоя». Для этого берут суспензию клеток того же вида, что и одиночная клетка, или близкого вида. Клеточная суспензия должна находиться в ранней экспоненциальной фазе ростового цикла. В 1959 году Бергман предложил фильтровать суспензионную культуру (в его экспериментах это были табак и фасоль) стерильно через один слой батиста (ячейки 0,3 * 0,1 мм). В результате получали суспензию, на 90% состоящую из отдельных клеток. Эту суспензию смешивали с агаризованной питательной средой того же состава, что использовался при культивировании суспензии (среда содержала 0,6% агара). Смесь разливали тонким слоем (1 мм) в чашки Петри. Агар разделял клетки, но не препятствовал обмену химическими сигналами между ними, а толщина слоя позволяла смотреть за их поведением под микроскопом.

Индукция делений отдельных клеток возможна при применении очень богатой питательной среды, например, среды Као и Михайлюка. При этом объем среды, в которую помещаются клетки, должен был минимальным (микрокапли объемом до 20 мкл).

4 МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ФОРМ КАРТОФЕЛЯ *IN VITRO*

Большое теоретическое и практическое значение представляет разработка технологии клонального микроразмножения картофеля из апикальных и аксиллярных меристем. Меристематические клетки менее дифференцированы и генетически более стабильны, чем клетки специализированных тканей, в результате чего регенерантное потомство проявляет высокую генетическую стабильность. Впервые работы в этом направлении были начаты в 70^х годах прошлого века. Приоритетная роль в изучении этого вопроса принадлежит канадским ученым, в частности доктору К. Kartha (Kartha K., 1984; Kartha K. et al., 1974). Эти работы посвящены регенерации целых растений *in vitro* из меристематических тканей, включающие в себя изоляцию почек или меристем с последующей индукцией побегообразования, микрочеренкования пробирочных растений и индукции ризогенеза у побегов. Для культивирования апикальных и пазушных меристем авторы предлагают применять питательные среды В5 и регуляторы роста (БАП и НУК) в малых концентрациях.

Значительный вклад в разработку техники микротиражирования картофеля внесли чешские исследователи под руководством доктора М. Griga (Griga M. et al., 1986; Griga M. et al., 1984a, 1984b). Авторы для микроразмножения картофеля предложили использовать питательные среды с минеральной основой MS и высокими концентрациями цитокининов.

Высокие коэффициенты размножения, полная идентичность исходному генотипу, возможность поддержания роста растений круглый год и ускорение селекционного процесса делают технику микроразмножения *in vitro* весьма эффективной и экономически выгодной для сохранения и поддержания редких и уникальных генотипов.

Морфогенетический ответ меристем картофеля на различное качественное и количественное содержание регуляторов роста приведен в таблице 8.

Таблица № 8 - Эффективность органогенеза первичных меристематических тканей картофеля

Среда	РОМАНО			СКАЗКА		
	число побегов	длина побегов, мм	число вторичных эксплантов	число побегов в	длина побегов, мм	число вторичных эксплантов.
MS ₃	1,1±3=0,1	21,3±1,4	-	0,9±0,1	20,4±1,6	-
MR ₁	3,3±0,2	29,9±1,9	18,2	2,5±0,3	23,0±1,7	15,5
MS ₂	5,1±0,4	18,2±0,9	5,1	3,8±0,3	15,5±1,3	3,7

Анализ эффективности морфогенеза у первичных эксплантов позволил выявить межсортовые различия. На питательных средах с регуляторами роста сорт Романо характеризовался более интенсивными процессами морфогенеза. Это выражалось в достоверно большем числе побегов на эксплант, независимо от содержания регуляторов роста в среде. Аналогичная тенденция отмечена и по длине побегов.

Хорошо сформировавшиеся на средах MS₂ и MR4 регенерантные побеги использовали в качестве вторичных эксплантов для микрочеренкования. С целью индукции пазушного ветвления сегменты побегов, состоящие из узла и пазушной почки, с соблюдением полярности, переносили на свежие среды.

В таблице 9 показана активность органогенеза вторичных эксплантов. Здесь прослеживаются те же тенденции, что и в первом пассаже. На среде MR (наблюдалось формирование достоверно меньшего числа побегов, но при этом длина побегов и число узлов свидетельствуют о большей степени развития побегов, по сравнению с эксплантами находящимися на среде MS₂. Если проследить за активностью органогенеза у сортов Романо и Сказка, то можно отметить, что по числу и длине побегов Сказка имела достоверно большие значения.

Таблица № 9 - Активность органогенеза вторичных эксплантов

Среда	Романо			Сказка		
	число побегов	длина побегов, мм	число узлов на побег	число побегов	длина побегов, мм	число узлов на побег
MR4	3,9±0,4	27,4±1,5	5,6±0,4	2,6±0,2	21,9±2,9	5,5±0,8
MS ₂	4,8±0,5	13,4±0,7	3,Ш,3	3,4±0,4	16,8±2,4	5,1±0,5

Сформировавшиеся в течение второго пассажа регенерантные побеги декапитировали, делили на две группы. Одна из которых использовалась для микрочеренкования и процесс микроразмножения шел по нарастающей. Другую группу побегов пересаживали на среду MR4 с низкой концентрацией цитокининов.

Основная цель микроразмножения заключается в том, чтобы за максимально короткий период времени получить максимальное число побегов. Однако, рядом исследователей (Катаева Н.В., Бутенко Р.Г., 1983) было отмечено, что использование высоких концентраций цитокининов для получения максимального коэффициента размножения и длительное культивирование в таких условиях приводит к постепенному изменению морфологии регенерирующих побегов, подавлению пролиферации побеговых почек. Способность побегов к образованию корневой системы снижается. Чередование циклов культивирования на питательных средах с высоким и низким уровнем цитокининов по теории Бутенко Р.Г. (1983) помогает

избежать токсического действия цитокининов и облегчает процесс ризогенеза.

Для укоренения лучшие использовать регенерантные побеги длиной 3-5 см., декапитированные в зоне узла. Через 2-3 недели культивирования побегов на ризогенной среде формируются корни нормальной морфологии и растения готовы к переводу в нестерильные условия (табл.10).

Таблица № 10 - Эффективность ризогенеза у регенерантных побегов картофеля

Параметры	Романо		Сказка	
	2Ri	3Ri	2Ri	3Ri
Число побегов	50	50	50	50
Длина побегов, мм	31,6±3,3	35,9±4,7	36,8±3,7	38,9±4,2
Число узлов на побег	7,2±0,7	7,4±0,7	7,0±0,6	7,1±0,6
Число побегов с корнями	30	28	31	32
Эффективность ризогенеза, %	60,0	56,0	62,0	64,0
Число корней на побег	5,3±0,9	6,2±1,3	5,1±0,7	9,1±0,9
Длина корней, мм	38,6±3,7	42,Ш,4	49,9±3,5	48,0±2,0

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что эффективность ризогенеза у изученных сортов была достаточно высокой. Достоверных сортовых различий по эффективности ризогенеза выявлено не было. На среде 3Ri сформировалось большее количество корней, чем на среде 2RL. Кроме того, иногда на среде 2Ri наблюдалось разрастание базальной части побегов и образование так называемой «пятки». При этом образование корней затруднялось. Поэтому, для индукции ризогенеза мы рекомендуем использовать среду 3Ri.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Определен оптимальный состав среды для индукции каллусогенеза у картофеля. Индукция каллусогенеза у картофеля наиболее эффективно протекает на питательной среде КГз содержащей 0,66 мг/л БАП + 5,0 мг/л ПУК. Эффективность каллусогенеза определяется сортовой и тканевой специфичностью экспланта.

2. Оптимизированы составы сред для индукции морфогенеза у картофеля. Подтверждены данные о решающей роли цитокининов при индукции морфогенетических процессов в каллусных тканях картофеля.

3. Установлена взаимосвязь между морфологической структурой каллуса и его регенерационной способностью. Показано, что плотный, компактный каллус отличается пониженной морфогенной активностью. Максимальный морфогенный потенциал отмечен у рыхлого глобулярного каллуса.

4. В длительно пассируемых каллусных тканях картофеля для обеспечения активных пролиферативных и регенерационных процессов, эффективно чередование циклов культивирования на средах MS1 (с низким содержанием НУК - 0,2 мг/л) и MS 12 (с более высоким содержанием НУК - 2,0 мг/л), через 3-4 пассажа (при неизменной концентрации БАП-5,0 мг/л). Выявлены генотипические различия по способности к длительному субкультивированию каллусных тканей.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ И РЕКОМЕНДАЦИИ ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ

1. Рекомендуется использовать методы клонального микроразмножения для сохранения коллекционного и ценного селекционного материала.

2. Рекомендуется использовать систему длительно пассируемых каллусных тканей для расширения спектра исходного материала в селекции картофеля.

3. Для создания исходного материала, характеризующегося повышенной засухоустойчивостью, рекомендуется проводить отбор на селективных средах с ПЭГ.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Азизходжаев А., Даминова Д.М. Культура генеративных органов при отдаленной межвидовой гибридизации хлопчатника // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. - М.: Наука, 1991. -С.117-119.
2. Артамонов В.И. Биотехнология - агропромышленному комплексу. -М.: Наука, 1989. -158 с.
3. Атанасов А.И. Биотехнология в растениеводстве. - Новосибирск, 1993.-242 с.
4. Аш О.А., Кузнецова О.И., Хартина Г.А., Гостимский С.А. Изучение регенерации растений из длительно культивируемого каллуса // The Biology of plant cells in vitro and biotechnology. - Saratov, 2003. - P.30-31.
5. Багрова А.М., Хартина Г.А., Епихов В.А. Получение длительно культивируемых морфогенных каллусов и регенерантов овощных и зерновых сортов // Биология культивируемых клеток и биотехнология. -Новосибирск, 1988. - С.272-273.
6. Багрова А.М., Ежова Т.А., Хартина Г.А., Гостимский С.А. Получение длительно культивируемых морфогенных каллусов и анализ соматической изменчивости у регенерантов зерновых и овощных сортов// Вестник МГУ. - Сер 16. биология, 1991. - №1. - С.28-33.
7. Батыгина Т.Б. Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей // Физиология растений. -1999. - Т.46. - № 6. - С888-898.
8. Батыгина Т.Б., Васильев В.Е., Маметьева Т.Б. Проблемы морфогенеза *in vivo* и *in vitro*. Эмбриогенез у покрытосеменных растений //Ботанический журнал. - 1978. - Т.63. - № 1. - С.87-111.
9. Бемянская С.Л., Исханов С.К., Шамина З.Б. Влияние стрессовых факторов на культуру клеток и проростки риса // Физиология растений, -1991.- Т.38. -№6.-С. 1218-1226.
10. Бемянская С.Л., Шамина З.Б. Получение и характеристика клонов риса, резистентных к стрессовым факторам // Физиология растений. - 1993. -Т.40.-№4.-С.681-685.
11. Бемянская С.Л., Шамина З.Б., Кучеренко Л.А. Морфогенез в клонах риса, резистентных к стрессовым факторам // Физиология растений. - 1994. -Т.41.-№4.-С.573-577.
12. Брайт С, Джарретт В., Нельсон Р., Крейссен Г., Карп А. Модификация хозяйственных признаков с использованием технологии *in vitro* // Биотехнология сельскохозяйственных растений. — М.: Агропромиздат, 1987.- С.234-246.
13. Бургутин А.Б. Микрклональное размножение винограда // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. -. М.: Наука, 1991.-С.216-221.
14. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений - М.: Наука, 1964. - 270 с.
15. Бутенко Р.Г. Тотипотентность растительной клетки и культура

тканей // Культура изолированных органов, тканей и клеток растений. - М., 1970.-С.84-92.

16. Бутенко Р.Г. Гормональная регуляция дифференцировки растительной клетки в культуре *in vitro* // Рост и гормональная регуляция жизнедеятельности растений. - Иркутск, 1974.-С.66-83.

17. Бутенко Р.Г., Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений - М.: Наука, 1975. - 51 с.

18. Бутенко Р.Г. Использование культуры тканей растений в сельскохозяйственной науке и практике // Сельскохозяйственная биология. -1979. - Т. 14. - №3. - С.306-315.

19. Бутенко Р.Г. Индукция морфогенеза в культуре тканей растений // Гормональная регуляция онтогенеза растений. - М.: Наука, 1984. — С.42-54.

20. Бутенко Р.Г. Клеточные технологии в селекционном процессе // Состояние и перспективы развития сельскохозяйственной биотехнологии. — Л., 1986.-С.29-38

21. Бутенко Р.Г. Клеточные технологии в сельскохозяйственной науке и практике // Основы сельскохозяйственной биотехнологии. - М.: Агропромиздат, 1990. - С. 154-236.

22. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе - М: ФБК-Пресс, 1999. - 160 с.

23. Бутенко Р.Г., Гостимский С.А. Изменчивость генома растительной клетки при культивировании в условиях *in vitro* // Биотехнология. - 1985. -№2. - С.79-85.

24. Бутенко Р.Г., Джардемалиев Ж.К., Гаврилова Н.Ф. Каллусообразующая способность эксплантов из разных органов разных сортов озимой пшеницы // Физиология растений. — 1986а. - Т.33. - Вып.2. -С.350-355.

25. Бутенко Р.Г., Джардемалиев Ж.К., Гаврилова Н.Ф. Регенерация растений из каллусных тканей, полученных из разных органов озимой пшеницы // Физиология растений. - 1986в. - Т.33. - Вып.5. - С.837-842.

26. Бутенко Р.Г., Шамина З.Б., Фролова Л.В. Индуцированный органогенез и характеристика растений, полученных в культуре тканей табака // Генетика. - 1967. - №3. - С.29-38.

27. Быкова Е.В., Лев СВ. Генотипические особенности процесса каллусогенеза у хлопчатника // Генетика. - 1988. — т.24. - №7. — С. 1317-1370.

28. Васильчук Н.С., Дьячук Т.И., Тучин СВ. Биотехнологические методы в селекции пшеницы и ячменя - достижения и перспективы // Достижения науки и техники АПК. - 2003. - №10. - С.34-38.

29. Высоцкий В.А. О генетической стабильности при клональном микроразмножении плодовых и ягодных культур // Сельскохозяйственная биология. - 1995. - № 5. - С.57-63.

30. Высоцкий В.А., Упадышев М.Т., Соломонова Ф.Н. Особенности регенерации растений изолированными пыльниками и листовыми дисками ягодных культур *in vitro* // Сельскохозяйственная биология. - 1998. - №3. -С.44-50.

31. Гапоненко А.К. Перспективы использования культуры клеток растений в селекции // Успехи современной генетики. - М.: Наука, 1987. - Вып.14. - С.64-74.
32. Гапоненко А.К., Маликова Н.И., Охрименко Т.Н., Созинов А.А. Получение соматональных линий у злаков (*Triticum aestivum* и *Hordeum vulgare* L.) // Доклады АН СССР. - 1985. - №6. - С.1471-1475.
33. Гирко В.С. Методы клеточной селекции в селекционных программах зерновых культур // Вестник сельскохозяйственной науки. — 1972.-№ 7-12.-С.85-88.
34. Глеба Д.М., Глеба Ю.Ю. Мутации и эпигенетические изменения в культуре клеток и протопластов высших растений // Цитология и генетика. -1978. - т.12. - №5. - С.458-469.
35. Гостимский С.А. Изменчивость генома растительной клетки при культивировании в условиях *in vitro* // Стабильность и изменчивость генома. М.: Наука, 1985. - С.16-26.
36. Гостимский С.А., Ежова Т.А., Багрова А.М. Генетический анализ соматональных изменений у посевного гороха // Биология культивируемых клеток и биотехнология - Новосибирск, 1988. - 4.2. - С.271-272.
37. Давоян Э.И. Мутагенез в культуре ткани риса и получение на его основе нового исходного материала // Генетика. - 1983. - Т. 19. - №10. - С.1714-1719.
38. Давоян Э.И. Генетическая детерминированность процессов каллусообразования и индукции регенерантов в культуре тканей риса // Генетика. - 1987. - Т.23. - № 2. - С.303-310.
39. Давоян Э.И., Сметанин А.П. Получение каллуса и регенерация растений риса// Физиология растений. - 1979. - Т.26. - Вып.2. - С.323-329.
40. Данилина А.Н. Особенности соматического эмбриогенеза в культуре ткани моркови // Культура изолированных органов, тканей и клеток растений. - М.: Наука, 1970. - С. 112-И 8.
41. Демченко СИ., Шпинькова Т.Е., Аветисов В.А. О стабильности генетических маркеров при дедифференцировке растительной клетки *in vitro*// Химический мутагенез и создание сортов интенсивного типа. М.: Наука, 1977.-0205-211.
42. Джигадло Е.Н., Джигадло М.И., Ряполова И.Н. Микрочлональное размножение сортов сливы и клоновых подвоев // Физиологические аспекты продуктивности растений. Орел, 2004. - С.259-262.
43. Дмитриева Н.Н. Особенности метаболизма белка и нуклеиновых кислот в процессе дедифференциации клеток сердцевинной паренхимы стебля табака // Культура изолированных органов, тканей и клеток растений. М.: Наука, 1970. - 0101-106.
44. Дмитриева Н.Н. Проблема регуляции морфогенеза и дифференциации в культуре клеток и тканей растений // Культура клеток растений. М. : Наука, 1981. - О 113-124.
45. Долгих Ю.И. Результаты и перспективы использования клеточной селекции для создания перспективных форм растений // Биотехнология в

растениеводстве, животноводстве и ветеринарии. -М., 2004. - С.Ц4-115.

46. Долгих Ю.И., Пустовойтова Т.И., Жданова Н.Е. Соотношение эндогенных фитогормонов в незрелых зародышах компетентных и некомпетентных к соматическому эмбриогенезу. линий кукурузы // Физиология растений. - 1999. - Т.46. - № 6. - С.861-864.

47. Долгих Ю.И., Степанова А.Ю., Гладков Е.А., Осипова Е.С. Получение растений, толерантных к неблагоприятным условиям окружающей среды, методом клеточной селекции // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии. -М., 2004. -С.136-138.

48. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта - М.:Колос, 1985.- 351с.

49. Дьячук Т.И., Дьячук П.А. Культура пыльников злаков: современное состояние, проблемы, перспективы // Сельскохозяйственная биология. — 1989.-№5.-С.3-10.

50. Егоров Н.С., Олескин А.В., Самуилов В. Д. Биотехнология. Проблемы и перспективы. - М.: Высшая школа, 1987. — Кн.1. - 159 с.

51. Ежова Т.А., Багрова А.М., Гостимский С.А. Побегообразование в каллусах из верхушек стеблей, эпикотилей, междоузлий и листьев различных генотипов // Физиология растений. - 1985. - Т.32. - Вып.3. - С.513-520.

52. Ежова Т.А., Гостимский С.А. Современные методы селекции высших растений на устойчивость к гербицидам (обзор) // Сельскохозяйственная биология. - 1989. - №1. - С.25-35.

53. Ежова Т.А., Тихвинская Н.С., Багрова А.М., Васильев И.Р., Маторин Д.Н., Гостимский С.А. Получение толерантных к гербицидам форм растений методом селекции *in vitro* // Доклады АН СССР.- 1990а. - Т.310. - №4. -С.987-989.

54. Еникеев Х.К., Высоцкий В.А., Плотникова Г.А. Развитие, зародышей вишни и черешни в культуре *in vitro* изолированных на ранних фазах эмбриогенеза // Сельскохозяйственная биология. - 1984. - №11. - С.46-48.

55. Загорска Н.А., Шамина З.Б., Бутенко Р.Г. Изучение растений-регенерантов, полученных в культуре тканей табака // Генетика. - 1971. - Т.7. - №3.-С.23-29.

56. Захленюк О.В., Алексеева И.В., Чернецкий ВЛХ, Кунах В.А. Влияние кинетина и глиацидина на культуру тканей табака // Культура клеток растений и биотехнология. - М., 1986. - С.37-41.

57. Захленюк О.В., Кунах В.А. Цитоплазматические и цитогенетические эффекты производных аденина в культуре тканей *Haplopappus gracilis* // Физиология растений. - 1987. - Т.34. - №3. - С.584-594.

58. Здруйковская-Рихтер А.И. Морфогенетические процессы в тканях изолированных зародышей ранних стадий развития плодовых деревьев // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. - М.: Наука, 1991.-С. 124-128.

59. Здруйковская-Рихтер А.И., Бабасюк М.С. Некоторые итоги исследований по культуре изолированных зародышей, генеративных органов и тканей растений // Бюлл. Никит. Ботан. Сада. - 1981. - Т.3. - № 46. - С.88-91.

60. Зеленов А.Н. Создание и генетический анализ нетрадиционной

формы гороха - хамелеон // Нетрадиционное растениеводство, экология и здоровье. - Симферополь, 1998.-С.355-356

61. Зеленов А.Н. Селекция гороха на высокую урожайность семян // Автор, дис. ... докт. с./х. наук. — Брянск, 2001. — 60с.

62. Игнатова С.А., Овсяк Т.Н., Лукьянюк С.Ф. Создание фузариозоустойчивого материала люцерны с использованием биотехнологических приемов // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. - М.: Наука, 1991.-С.13 7-141.

63. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полишук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений - Киев: Наукова Думка, 1980. -487с.

64. Каллак Х.И., Кыйвеэр А.Ю. Цитогенетическая и морфогенетическая реакция растительных культур тканей на отсутствие экзогенных регуляторов роста в питательной среде // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. - М.: Наука, 1991. - С.128-133.

65. Карабаев М.К., Джардемалиев Ж.К. Культивируемые клетки пшеницы и кукурузы. Морфогенез и толерантность // Физиология растений. -1994. - Т.41. - № 6. - С.807-814.

66. Картель Н.А., Манешина Т.В. Регенерация растений ячменя в культуре каллусной ткани // Физиология растений. - 1977. — Т.25. - В.2. — С.283-287.

67. Касаева К.А, Применение биотехнологических методов в селекции растений. - М., 1989. - 51 с.

68. Катаева Н.В., Аветисов В.А. Клональное размножение растений в культуре ткани // Культура клеток растений. - М.: Наука, 1981. - С. 137-150,

69. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. - М.:Наука, 1983. - 97 с.

70. Кацы Е.И. Участие ауксинов в регуляции экспрессии генов бактерий и растений //Генетика. - 1977. - Т.33. - С.565-576.

71. Кириллова Г.А. Явление гаплоидии у покрытосеменных растений // Генетика. - 1966. - №2. - С. 137-147.

72. Киселев Е.П., Анненков Б.. Особенности и перспективы использования методов биотехнологии в селекции картофеля на Дальнем Востоке // Сельскохозяйственная биология. - 1989. - №5. - С.11-16.

73. Ковалев В.М. Технологии будущего в селекции // Сельскохозяйственная биотехнология. - М.: Воскресенье, 2000. - Т.1. -С.228-240.

74. Ковалева Т.А., Шамина З.Б., Бутенко Р.Г. Цитологическое изучение культуры ткани раувольфии (*Rauwolfia Serpentina* Benth) // Генетика. - 1968. -Т.4.-№5.^С.5-13.

75. Копертех Л.Г., Бутенко Р.Г. Тестирование на солеустойчивость растений-регенерантов пшеницы // Доклады РАСХН. - 1997. - №1. — С.21-22.

76. Костюченко Д.А. Биотехнологические приемы расширения исходного материала для селекции люпина // Автор, дис. ...канд. с./х. наук. -Орел., 2004.-18с.

77. Косулина Л.Г. Особенности процесса регенерации в каллусной культуре зрелых зародышей пшеницы (*Triticum Aestivum* L.) // Сельскохозяйственная биология. - 1995. - № 1. - С.78-84.
78. Кренке Н.П. Регенерация растений - М-Л.: Издательство АН СССР, 1950.-672 с.
79. Кубалакова М_м Гавел Л. Использование культур тканей в процессе селекции у *Lilium* L. // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. - М: Наука, 1991. - С.206-209.
80. Кузьмина Н.А., Гладких Е.С. Устойчивость твердой пшеницы к осмотическому стрессу при культивировании *in vitro* и ее урожайность в полевых условиях // Физиология растений - наука III тысячелетия. IV съезд общества физиологов России. М., 1999. - Т.2. - С.614.
81. Кунах В.А. Особенности культуры изолированных тканей растений как клеточной популяции в связи с перспективой применения ее в генетике и селекции // Экспериментальная генетика растений. - Киев: Наукова Думка, 1977.-С.112-123.
82. Кунах В.А. Изменчивость числа хромосом в онтогенезе высших растений // Цитология и генетика. - 1978. -Т.12. - №2. - С.160-173.
83. Кунах В.А. Цитогенетическая изменчивость клеточных популяций в культуре изолированных тканей растений // Тканевые и клеточные культуры в селекции растений. - М.: Колос, 1979. — С.38-51.
84. Кунах В.А. Особенности структурного мутагенеза в популяциях культивируемых клеток растений // Успехи современной генетики. - М.: Наука, 1984. - №12. - С.30-62.
85. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. Изменчивость в онтогенезе. // Биополимеры и клетка - 1994. - Т. 10. - №6. -С.5-35.
86. Кунах В.А. Изменчивость растительного генома в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro* // Физиология растений. — 1999. - Т. 46. - №6. - С.919-929.
87. Кунах В.А., Зосимович В.П. Влияние кинетина на уровень и типы аббераций хромосом в культуре тканей *Haplopappus gracilis* // Генетика. -1977. - Т.13. - №8. - С.1355-1365.
88. Кунах В.А., Сидоренко П.Г., Зосимович В.П. Влияние кинетина на репродукцию клеток различной ploidy // Успехи полиплоидии. - Киев: Наукова думка, 1977. - С.203-215.
89. Кучеренко Л.А. О некоторых параметрах технологии регенерации риса *in vitro* // Сельскохозяйственная биология. - 1994. - № 1. - С.74-76.
90. Кучеренко Л.А., Мамаева Г.Г. Каллусогенез и органогенез в культуре ткани различных сортов риса // Сельскохозяйственная биология. -1980. - Т.15. - № 3. - С.384-386.
91. Кучеренко Л.А., Харченко П.Н., Ковалева Е.Н. Использование методов биотехнологии в селекции риса // Состояние и перспективы развития сельскохозяйственной биотехнологии. - Л., 1986. - С.94-98.
92. Кучко А.А., Маруненко И.М. Культура изолированных пыльников

картофеля // Сельскохозяйственная биология. - 1983. - №5. - С. 16-19.

93. Кучко А.А., Маруненко И.М. Особенности морфогенеза в каллусной ткани различных сортов картофеля // Теоретические и прикладные аспекты биотехнологии. - Киев, 1991. - С.9-14.

94. Левенко Б.А., Юркова Г.Н., Кунах В.А., Легейда В.С. Поведение пыльников пшеницы и ржи в изолированной культуре // Экспериментальная генетика растений. - Киев, 1977. - С. 123-131.

95. Ли М., Ван Г., Лин Ц. Кальций способствует адаптации культивируемых клеток солодки к водному стрессу, индуцированному полиэтиленгликолем // Физиология растений. - 2004. — Т.51. - №4. — С. 575-581.

96. Литовкин К.В., Игнатова С.А. Влияние генотипа на морфогенез в культуре тканей ячменя // Матер. II Междунар. Конф. «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». - М., 2000. - С.31-33.

97. Лукьянюк С.Ф., Игнатова С.А. Метод гаплоидии в селекции зерновых культур // Сельскохозяйственная биология. - 1983. - №5. - С.8-15.

98. Лутова Л.А., Бондаренко Л.В., Бузовкина И.С., Левашина Е.А., Тиходеев О.Н., Ходжайова Л.Т., Шарова Н.В., Шишкова С.О. Влияние генотипа растения на регенерационные процессы // Генетика. - 1994. - Т.30. - №8.-С. 1065-1074.

99. Ляпкина Н.С. Изучение спонтанных и индуцированных мутаций, возникающих в длительно культивируемых каллусных тканях гороха // Автор, дисс. ... канд. биол. наук. - М, 1990. - 18с.

100. Маруненко И.М., Кучко А.А., Бутенко Р.Г. Физиологические аспекты получения гаплоидов картофеля методом культуры пыльников // Физиология растений.- 1988.-Т.35. -№1.-С.136-143.

101. Мезенцев А.В. Индуцированный каллусо- и морфогенез в культуре ткани люцерны и возможности его регуляции // Сельскохозяйственная биология. - 1980. - Т.15. - № 3. - С.379-383,

102. Мезенцев А.В., Карелина Н.А. Влияние генотипических особенностей люцерны на каллусообразование и соматический эмбриогенез при различных условиях культивирования тканей // Генетика. - 1982. - Т. 17. -С.999-1003.

103. Мелик-Саркисов О.С., Аветисов В.А. Перспективы клеточной биотехнологии в картофелеводстве // Состояние и перспективы развития сельскохозяйственной биотехнологии. — Л., 1986. - С.81-87

104. Мелик-Саркисов О.С., Черезанова Л.В., Овчинникова В.Н. Экзогенные фитогормоны как фактор цитогенетической изменчивости клеток картофеля в культуре *in vitro* // Сельскохозяйственная биология. -1994.-Ш.-С.69-73.

105. Миляева Э.М., Константинова Т.Н., Баврина Т.В., Аксенова Н.П. Способность различных тканей стебля табака Трапезонд к образованию каллусов и почек//Доклады АН СССР. - 1972. - Т.201. - № 1. - С.242-245.

106. Митрофанова О.В. Разработка биотехнологии ускоренного размножения в стерильной культуре цветочных растений на безвирусной

основе // Состояние и развитие сельскохозяйственной биотехнологии. — Л., 1986.-С.101-104.

107. Михайлов О.Ф., Бессонова В.П. Цитогистологическая картина дифференцировки новообразований в каллусе изолированной семядоли гороха // Культура изолированных органов, тканей и клеток растений. - М.: Наука, 1970.-С. 123-127.

108. Морель Ж. Борьба с вирусными болезнями растений с помощью культивирования тканей // Сельскохозяйственная биология. - 1967. - Т.2. -№4. - С.622-628.

109. Морозова СЕ. Продолжительность сохранения, регенерационной способности у каллусов пшеницы // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. - М.: Наука, 1991. - С.256-260.

110. Муравлев А.А., Шелагина В.В. Способы отбора каллусных клонов ярового рапса, устойчивого к водному стрессу // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии.-М., 2000.-С.187-188.

111. Alimgazinova B.S. State of agricultural plant biotechnology in Kazakhstan // The biology of plant cell in vitro and Biotechnology. - Saratov, 2003.- P.18-19.

112. Ammirato P.V. Embryogenesis // Handbook of plant cell culture. V. Techniques for propagation and breeding. -N-Y, - 1983. VI.-P.82-123.

113. Atanassov A.J., Mehandjiev A.D. In vitro induced morphogenesis in pea embryos // Comptes rendus de l'Academie bulgare des Sciences. — 1979. — V32. — No.1.-P.115-118.

114. Bayliss M.V. Chromosomal variation in plant tissue in culture // Inter. Rev. Cytol. Suppl.- 1980. - P. 113-144.

115. Bliznyuk L.G., Kondratskaya LP. Biotechnological methods of the Meadow clover selection // The biology of plant cell in vitro and Biotechnology. -Saratov, 2003. - P.48-49.

116. Bressan R.A., Hasegawa A.K., Handa Resistance of cultured higher plant cells to polyethylene glycol-induced water stress // Plant science letters. - 1981. -V.21.-P.23-30.

117. Cardi T., Adamo F., Filippone E. In vitro rooting of differentiated shoots in various genotypes of pea // Genet Breed. - 1991. - V.45. — No. 1. - P.67-69.

118. Chaleff R.S. Isolation of ergonomically useful mutants from plant cell cultures // Science. - 1983. - V. 219. -No.4585. - P.676-682.

119. D'Amato F. Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerates // Critical reviews in plant Sciences. - 1985. - V.3. - P.73-112.

120. De K.K., Roy S.C. Morphogenetic investigation on pea under in vitro conditions // Bulletin of the Torrey botanical club. - 1985. - V.1 12.- No.4.-P.363-367.

121. Devreux M. Regeneration of numerous shoots by in vitro culture of young pea embryos // The Pisum Newsletter. - 1970. - V.2. - P. 12.

122. Edallo S., Zucchinali C, Perzenzin M, Salamini F. Chromosomal variation and frequency of spontaneous mutation associated with in vitro culture and plant regeneration in maize // Maydica, - 1981. - V. 26, - P.39-56.

123. Evans D.A. Somaclonal variation // *Plant biology*. -1987. - No.4. - P.59-69.
124. Ezhova T.A. Genetic control of plant cell morphogenesis in an in vitro culture // *The Biology of plant cells in vitro and biotechnology*. - Saratov, 2003. -P.96-97.
125. Filippone E., Cardi T. Exploitation for breeding of in vitro culture of pea explants // *Genetic manipulation in plant breeding*. - 1986. -P.461-463.
126. Freytag A.H., Rao-Arelli A.P., Anand S.C., Wrather J.A., Owens L.D, Somaclonal.variation in soybean plant regenerated from tissue culture // *Plant cell Reports*. - 1989. - V.8. -No.4. - P. 199-202.
127. Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // *Can. J. Biochem.* - 1968. - V.46. -No.5.-P.417-421.
128. Griga M. The study of in vitro regeneration systems in pea, Horse bean and soybean // *Autoref. Kandidata boil.ved.* - Brno, 1990. - 28p.
129. Griga M. Direct somatic embryogenesis from shoot apical meristems of pea, and thidiazuron-induced high conversion rate of somatic embryos // *Biologia Plantarum*. - 1998. - V.41. - No.4. - P.481-495.
130. Griga M., Stejskal J., Klenoticova H. Plant regeneration in soybean, pea and faba bean via somatic embryogenesis // *Conference europeenne sur les proteagineux*. - Angers, 1992. - P.107-108.
131. Griga M., Tejklova E., Novak F. In vitro propagation of pea by axillary and adventitious bud technique // *Proc. Intern. Symp. Plant Tissue Cell Cult.* -Olomouc, 1984a.-P.507-508.
132. Gosal S.S., Bajaj Y. Establishment of callus tissue cultures and the induction of organogenesis in some grain-legums // *Crop Improv.* - 1979. - V.6. -P.154-160.
133. Handa A.K., Bressan R.A., Handa S., Hasegawa P.M. Clonal variation for tolerance to polyethylene glycole-induced water sterss in culturel tomato cells // *Plant Physiol.*, 1983. - V.72. - P.645-653.
134. Haskins R.H., Kartha K.K. Freeze preservation of pea meristems: cell survival // *Canad. J. Bot.* - 1980. - V.58. - P.833-840.
135. Heinz D.J., Krishnamurthi M., Nickell L.G., Marezki A. Cell, tissue and organ culture in sugarcane improvement // *Plant cell, tissue and organ culture*. — N-Y-L., 1977.-P 3-17.
136. Hildebrandt A.C., Wilmar J.C., Johns H., Riker A.J. Growth of edible chlorophyllous plant tissues in vitro // *Am. J. Bot.* - 1963. - No.50. - P.248-254.
137. Jacobsen H.-J. Biotechnology applied to grain legumes-current state andprospects // 1 *Conference europeenne sur les proteagineux*. - Angers. - 1992. -P.99-103.
138. Jacobsen H.-J., Salha A.A. Genotype-dependent callus growth in pea // *The Pisum Newsletter*. - 1984. - V.16. - P.27-28.
139. Kartha K.K., Leung NX., Gamborg OX. Freeze-preservation of pea meristems in liquid nitrogen and subsequent plant regeneration // *Plant Science Letters*.-1979.-V. 15.-P.7-15.

140. Kartha K.K. Culture of shoot meristems Pea // Cell culture and somatic cell genetics of plants. -1984. - V.1. - C.106-110.
141. Kosturkova G., Rodeva R., Mehandjiev A. In vitro selection systems for Ascochyta Pisi filtrates and herbicide tolerance on pea // 4 European Conference on Grain Legumes. - Cracow, 2001. Part II-P.158-159.
142. Kubalaková M., Tejklová E., Griga M. Some factors affecting root formation in in vitro regenerated pea shoots // Biol. Plant. - 1988. - V.30. - P. 179
143. Kysely W., Jacobsen H.-J. Somatic embryogenesis from pea embryos and shoot apices // Plant Cell Tissue Organ Cult. - 1990. - V.20. - No. 1. - P.7-14.
144. Larkin P.J., Ryan S.F., Brettell R.I., Scowcroft W.R. Heritable somaclonal variation in wheat // Theor. Appl. Genet. — 1984. - V.67. - No.4. -P.443-455.
145. Larkin P.J., Scowcroft W.R. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell culture for plant improvement // Theor. Appl. Genet. - 1981. -V.60.-P.197-214.
146. Larkin P.J., Scowcroft W.R. Somaclonal variation and crop improvement // Genetic engineering of plant an agricultural perspective. -Canberra, 1983. -P.289-314.
147. Lee M., Phillips R.L. The chromosomal basis of somaclonal variation // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. - 1988. - V.39.
148. Loiseau J., Marche C, Le Deunff Y Effects of auxins, cytokinins, carbohydrates and amino acids on somatic embryogenesis induction from shoot apices of pea // Plant Cell Tissue Organ Cult. - 1995. - V.41. -P.267-275.
149. Maliga P. Isolation and characterization of mutants in plant cell culture // Annual review of plant physiology. - 1984. - V.35. - P.519-542.
150. Maliga P. Isolation, characterization and utilization of mutant cell lines in higher plants // Inter. Rev. Cytol. Suppl.- 1980. - P.225-250.
151. Malmberg R.L. Regeneration of gene lines of *Pisum sativum* from callus cultures // The Pisum Newsletter. - 1979a. - V.1 1. - P.21-22.
152. McCoy T., Phillips R., Rines H. Cytogenetic analysis of plant regenerated from oat (*Avena sativa*) tissue culture; high frequency of partial chromosome loss // Canad. J. Genet. and Cytol. - 1982. - V.24. - P.37-50.
153. Molkanova O.L, Vetchinkina E.M., Suchkova N.K. Conservation of valuable plant genofond by tissue cultures // The biology of plant cell in vitro and Biotechnology. - Saratov, 2003. - P.210-211.
154. Mroginski L.A., Kartha K.K. Tissue culture of legumes for crop improvement // Plant Breeding Reviews. - 1984. - V.2. - P.215-264.
155. Murashige N., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. - 1962. —V.15. - No. 13. -P.473-497.
156. Murashige T. Manipulation of organ culture in plant tissue cultures // Botanical Bulletin Academia Sinica. - 1974a. - V.18. - P. 1-24.
157. Negrutti J., Beefink F., Jacobs M. *Arabidopsis thaliana* as a model system in somatic cell genetics. 1. Cell and tissue culture. - Plant Sci. Lett., 1975.

-V.5.-NO.5.-P.293-304.