30. *Харрисон Дж., Уайнер Дж., Таннер Дж., Барникот Н.* Биология человека. М., 1967.
31. *Bateman A. J.* Heredity, *2*, 349—368, 1948.
32. *Brilharz R. G.* Proc. Aust. Soc. Anim. Prod., *3*, 139, 1961.
33. *Beilharz R. G.* J. Genet., *58*, 441—449, 1963.
34. *Brumby P. J.* Heredity, *14*, 1, 1960.
35. *Clutton-Brock T. H., Harvey P. H.* J. Zool., *183*, 1—39, 1977.
36. Congenital malformations. Geneve: World Health Organization, 128, 1966.
37. *De Fries J. C., Mc Clearn G. E.* Amer. Naturalist, *104*, 408—411, 1970.
38. *Gluksmann A.* Sexual Dimorphism in Human and Mammalian Biology and Pathology. Acad. Press, London, 1981.
39. *Horn J. M.* Behavior Genetics, *4*, 373—381, 1974.
40. *Le Boeuf B. J.* American Zoologist, *14*, 163—176, 1974.
41. *Le Boeuf B. J., Peterson R. S.* Science, *163*, 91—93, 1969.
42. *Levine L.* American Naturalist, *92*, 21—26, 1958.
43. *Levine L., [illegible] R.* American Naturalist, *101*, 189—191, 1967.
44. *Morley F. N., Smith J. A.* Agric. Gaz., N. S. Wales, *65*, 1, 17, 1954.
45. *Pahnish O. F., Stanley E. B., Bogart R., Rubisek C. B.* J. Animal Sci., *20*, 454, 1961.
46. *Roberts E., Card L.* Proc. 5-th Worlds Poultry Congr., *2*, 353, 1933.
47. *Saeki Y., Kondo K.* Japan J. Breed., *6*, 1, 65, 1956.
48. *Warren D.* Genetics, *19*, 600, 1934.
49. *Warren D.* Kansas Agric. Exptl. Sta. Techn. Bull. 52, 1942.
50. *Wiley R. H.* Animal Behaviour Monographs, *6*, 85—169, 1973.

Поступило 11.XI 1984 г.

Биолог. ж. Армении, т. 39, № 10, с. 834—847, 1986.

ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ КЛЕТОЧНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЯ

О. С. МЕЛИК-САРКИСОВ

Всесоюзный научно-исследовательский институт прикладной молекулярной биологии и генетики, Москва

Аннотация — Методы культуры клеток, тканей и органов растений используются в практической селекции и растениеводстве как эффективное средство по расширению генетического разнообразия культур, получению гаплоидов, отбору форм, устойчивых к экстремальным температурам, насекомым, патогенам и т. д. Эти методы могут значительно сократить продолжительность селекционного процесса, ускорять размножение, а доступность методов культуры тканей позволяет применить их уже сейчас в сельскохозяйственном производстве.

[illegible]

Abstract—The analysis of progress and prospects for the use of plant cells, tissues and organs in the works on the development of new valuable

plant forms and varieties is given. The problems connected with the obtaining of cultures of cells, tissues and organs of promising mutant forms, gaploids, polyploids, certain sexual and somatic hybrids are considered. The availability of some methods causing the possibility of applying them now directly into the agricultural production is mentioned that might in the nearest future provide appreciable practical results.

Ключевые слова: клеточная биотехнология растений, проблемы и перспективы.

Первая «зеленая революция», давшая плоды в середине 1960-х годов, выразилась в интенсификации традиционных методов растениеводства. В результате упорной, чуть ли не двадцатилетней работы по перекрестному опылению были выведены новые линии кукурузы, риса, пшеницы, что вместе с применением химических удобрений и пестицидов привело к значительному росту урожайности. Тем не менее более 20% населения земного шара голодает или недоедает. Даже в развитых странах сокращаются валовые сборы сельхозпродуктов из-за застройки плодородных земель, растущей засоленности орошаемых почв, ограничения применения пестицидов. Очевидно, что традиционные методы не в состоянии решить проблему, нужна вторая «зеленая революция».

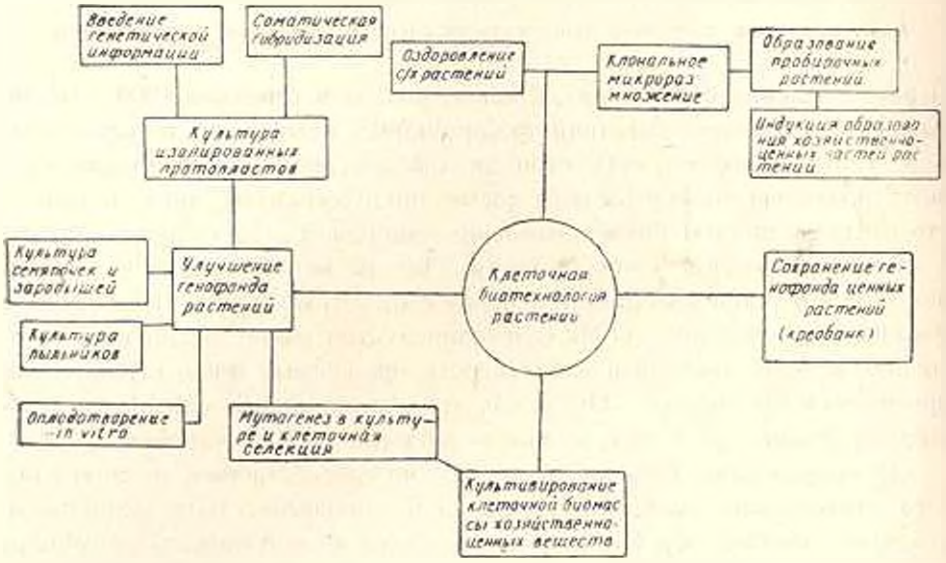
В значительной степени этому должно способствовать развитие нового направления современной биологии—биологической технологии, разрабатывающей научные основы процессов, базирующихся на использовании биологических агентов и реакций. Для реализации этих процессов используют живые клетки, субклеточные структуры и изолированные биомолекулы.

На сегодняшний день условно биотехнологию подразделяют на клеточную (прикладная микробиология, культура растительных и животных клеток), генетическую и молекулярную.

Остановимся лишь на некоторых аспектах использования в биотехнологии растительных клеток, уникальной особенностью которых является их тотипотентность, т. е. возможность получения из изолированных клеток целого растения. Большие успехи в области культивирования клеток и тканей растений, достигнутые в настоящее время, могут быть использованы при решении многих важных практических задач, стоящих перед сельскохозяйственным производством [1, 13, 17, 21, 27, 34, 60], в частности, для получения новых высокопродуктивных и устойчивых к заболеваниям и неблагоприятным факторам среды растений, а также оздоровления и размножения оздоровленных сортов, сохранения и улучшения генофонда (рис.).

Анализ достижений и перспектив применения методов культуры клеток, тканей и органов растений для получения новых ценных форм и сортов сельскохозяйственных культур показал, что этот метод, как и появление мутагенов, дал селекционерам в дополнение к гибридологическому методу новое мощное средство, с помощью которого удалось в сотни и тысячи раз увеличить частоту мутирования растений. С помощью радиационного и химического мутагенеза в нашей стране уже выведено более 200 новых сортов, большинство из которых получено при обработке семян мутагенами. Однако предпочтительнее обраба-

тывать ими не такие многоклеточные образования, как семена, а относительно более простые структуры, например, отдельные клетки или изолированные протопласты, что дает определенные преимущества по сравнению с традиционной обработкой семян.



Основные направления работ по клеточной биотехнологии сельскохозяйственных растений.

В условиях культуры in vitro все обработанные клетки находятся в одинаковых, контролируемых экспериментатором условиях, чего невозможно добиться в полевом эксперименте, при этом протопласты, а в меньшей степени и клетки, получают примерно одинаковую дозу мутагена. Кроме того, селекционер, пользующийся традиционным способом, имеет дело с сотнями, в лучшем случае тысячами растений, тогда как исследователь, работающий на клеточном уровне, оперирует уже сотнями миллионов клеток. Оптимальные условия, создаваемые в культуре in vitro, дают возможность сохраниться возникающим мутантным клеткам, которые часто характеризуются пониженной скоростью размножения по сравнению с нормальными и не выдерживают конкуренции с ними в системе целого организма.

Содержащиеся в питательных средах, на которых выращивают клетки, разные биологически активные соединения сами порой оказывают мутагенное действие [46], и это приводит к получению большего числа измененных форм.

Известно, что среди растений-регенерантов в культуре ткани может наблюдаться значительное разнообразие [4, 32, 43], тем большее, чем длительнее была стадия каллусного роста. Это позволяет использовать культуру ткани для получения генетически измененных, так называемых «сомаклональных» форм, которые могут служить исходным материалом в селекционном процессе [43]. Так, был выделен у сахар-

ного тростника мутант, устойчивый к вирусу мозаичной болезни тростника [32].

Работа на гаплоидном уровне резко сокращает время до фенотипического проявления мутаций, так как рецессивная мутация не будет маскироваться нормальной аллелью в M_1 поколении. Кроме того, сокращение периода между возникновением и фенотипическим проявлением мутанта позволяет сохраниться и реализоваться большому числу возникших мутантных клеток.

Сейчас, когда имеются мощные источники индукции изменчивости, на первый план выдвигается задача отбора и сохранения возникших мутантных клеток, из которых вследствие тотипотентности растительной клетки можно в ряде случаев вырастить целые растения с нужными свойствами.

Такой отбор ведут обычно на специальных селективных средах [29], особенно при работе на признак устойчивости к патогенам. Используют также селективные условия выращивания, например, экстремальные температуры [18] при отборе форм, устойчивых к низким или высоким температурам, и т. д.

В ряде случаев устойчивость растений к фитопатогенному грибу коррелирует с устойчивостью к его токсину [35]. На среде, содержащей метионинсульфоксимин, структурный аналог токсина, вырабатываемого *Pseudomonas tabaci* (Wolf et Foster) Stevens, был получен мутант табака, устойчивый к метионинсульфоксимину [29]. Используя в качестве селективного фактора культуральные фильтраты грибов *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary, *Fusarium oxysporum* Schlecht удалось получить устойчивые к фильтратам клоны картофеля [23, 24]. Растения картофеля, регенерировавшие из устойчивых клеточных клонов, меньше поражались фитофторой, чем обычные контрольные регенеранты [25].

К сожалению, устойчивость на клеточном уровне не всегда коррелирует с устойчивостью целого растения, иногда она связана не с мутацией, а с изменением активности гена [44], и, кроме того, из-за сложных и многообразных взаимоотношений между патогеном и растением-хозяином часто трудно подобрать специфический селективный фактор для отбора устойчивых клеток.

Клеточную селекцию очень важно вести на уровне одноклеточного клона, что позволяет избежать химерности возникающего потомства. Специально разработанные методы культивирования клеток и протопластов дают возможность выращивать их с очень низкой плотностью (10—100 клеток в мл среды) и затем изолировать колонии, возникающие из отдельных клеток. Для этого применяют специально обогащенные среды [41], кондиционированные среды [40] или метод «кормящего слоя», при котором клетки или протопласты, «заплавленные» в нижний слой агара, инактивируют облучением, и они служат в качестве питающего субстрата для посеянных с небольшой плотностью в верхнем слое агара живых клеток [55, 56]. Разработана техника микрокультивирования единичных изолированных протопластов [36].

В мутационной селекции часто приходится иметь дело с генетическими химерами. Если генетическая химера имеет четкое фенотипическое проявление химерности (например, по окраске), исследователь может применить методы культуры ткани для расхимеривания и получения клонов растений с ценными признаками. Например, при выращивании на провокационном фоне растений M_1 можно отобрать такие, у которых часть листовой пластинки не поражена болезнью. Это может быть обусловлено либо структурным иммунитетом, либо локальными изменениями генетического материала в небольшом участке соматической ткани. В последнем случае представляется перспективным получение культуры in vitro из непораженных тканей и последующая регенерация из нее растений, которые могут оказаться устойчивыми к возбудителю болезни. Так был получен толерантный к гербициду 2,4-Д мутант табака в результате регенерации растения из участка зеленой ткани, обнаруженного на одном из листьев, «отбеленных» при обработке растений 2,4-Д [54]. Эффективным может оказаться этот метод и в работе с декоративными культурами, где большое значение имеет окраска листьев и цветков.

При отдаленной гибридизации часто образуются неполноценные семена с недоразвитым зародышем. Культивирование таких гибридных зародышей на специальных питательных средах способствует нормальному их развитию и образованию из них гибридных растений. Так получены межвидовые гибриды томатов, тыквенных, картофеля, красного клевера и других культур [6, 50, 52, 58].

Крюз [42] разработал технику выращивания гибридных зародышей в культуре in vivo/vitro, когда гибридные зародыши культивируют на изолированном эндосперме одного из родительских видов, выращиваемом на питательной среде. Этим методом удалось добиться прорастания 70% гибридных зародышей, полученных при скрещивании *Hordeum L.×Triticum L.* Такое совмещение традиционного гибридологического метода с методом культуры in vitro может стать эффективным средством создания новых форм отдаленных гибридов.

При селекционной работе с использованием метода отдаленной гибридизации иногда возникают нежизнеспособные гибриды, погибающие на ранних стадиях развития, не способные расти даже на специальных питательных средах. Тогда на помощь может прийти метод культуры ткани. Так, проростки гибридов *Nicotiana occidentalis* Wheeler с культурными сортами табака обычно не образовывали корешков и погибали на семядольной стадии. В каллусе, полученном из этих проростков, удалось индуцировать регенеранты, которые хорошо укоренялись и росли в почве [16].

Метод оплодотворения in vitro используют для получения половых гибридов [69] в тех случаях, когда добиться оплодотворения другим путем не удается, однако широкого практического применения этот способ пока еще не получил.

На возможность и перспективность использования гаплоидов в селекции указывал еще в 1932 г. Вавилов [31]. В настоящее время гаплоиды получены у более чем 50 видов растений [22], в том числе у та-

ких экономически важных культур, как картофель, томаты, рапс, пшеница, рис и др.

Явление гаплоидии в селекционной практике может использоваться для создания гомозиготных диплоидов, которые в несколько раз ускоряют получение гетерозисных гибридов [3]. Создание полностью гомозиготных линий картофеля позволит размножать его и семенами [12], что может дать большой экономический эффект. Гаплоиды необходимы для преодоления межвидовой несовместимости, селекции на более низком уровне плоидности, что особенно важно для многих сельскохозяйственных культур, являющихся тетраплоидами [66]. Несложный математический расчет показывает, что если для отбора рецессивной гомозиготы по трем факторам на тетраплоидном уровне в F_2 необходимо иметь 45—50 тыс. растений, то на диплоидном—всего 70—100 растений.

Однако спонтанная частота возникновения гаплоидов очень низка и составляет всего 10^{-4} — 10^{-6}. Повысить частоту их возникновения можно, используя различные физические и химические факторы (облучение пыльцы, воздействие экстремальными температурами, химическими мутагенами и т. д.), при межвидовых скрещиваниях и т. д. [15].

Одним из сравнительно новых методов экспериментального получения гаплоидных растений служит индукция гаплоидов при культивировании in vitro пыльников и микроспор. В отличие от методов, при применении которых гаплоиды возникают в результате гиногенеза, в культуре in vitro пыльников наблюдается образование так называемых андрогенетических гаплоидов, что может, по-видимому, сказаться и на свойствах последних.

Существует два принципиально различных способа получения гаплоидов в культуре in vitro пыльников. В одном случае микроспоры в пыльниках, культивируемых на специальных средах, развиваются в гаплоидные эмбриоиды [64], в другом — гаплоидные растения-регенеранты возникают в каллусных тканях, образовавшихся из микроспор при культивировании пыльников [38]. Каждый из этих методов имеет свои достоинства и недостатки. При эмбриогенезе в культивируемых пыльниках образуются, как правило, гаплоидные эмбриоиды, развивающиеся затем в гаплоидные растения. Во втором случае среди регенерантов из каллуса встречаются не только гаплоидные, но и растения другой плоидности [49], которые могут возникать как из соматических клеток пыльника, так и при эндомитозе в гаплоидных клетках. Кроме того, не всегда удается получить регенеранты в каллусе, возникшем из пыльников. В то же время эндомитотическое удвоение числа хромосом в гаплоидных клетках каллуса позволяет избежать последующей операции по диплоидизации гаплоидов.

В последние годы получены гаплоиды у дурмана, табака, петунии при непосредственном культивировании на питательных средах изолированных микроспор [12], причем у табака таким способом уже созданы сорта.

Успешное получение гаплоидов при культивировании in vitro пыльников зависит от многих факторов: генетических (гаплоиды томатов получены лишь в 3 линиях из 43 [38]); стадии развития пыльцы (эм-

брогенное развитие ее возможно лишь в определенный период, чаще на одноядерной и ранней двуядерной стадиях, тогда как каллусообразование из пыльцы можно индуцировать на разных стадиях ее развития); состава питательной среды; физических факторов культивирования и т. д. [14].

Эффективность тех или иных методов получения гаплоидов может быть различна для отдельных культур [12]. Хотя в некоторых случаях гаплоидная селекция уже начинает применяться в полевых опытах (например, гаплоид риса в КНР), все же она еще не нашла широкого применения в практике. Это связано главным образом с отсутствием высокоэффективных, позволяющих получить гаплоиды в больших количествах, методов. Поэтому основные усилия ученых должны быть направлены на их разработку.

Многие сорта культурных растений (пшеница, картофель, табак, сахарная свекла и др.), в том числе декоративных культур, являются полиплоидными [5]. В большинстве случаев они обладают повышенной жизнеспособностью, обеспечивают повышение качества и количества урожая, и поэтому работа с ними занимает не последнее место в селекционной практике. Часто для успешной гибридизации приходится повышать уровень плоидности у одного из партнеров или полиплоидизовать бесплодные гибриды, удваивая у них число хромосом для получения фертильных амфидиплоидов.

Классическая методика получения полиплоидов с помощью колхицина включает в себя либо проращивание семян в растворе этого препарата, либо обработку им всего проростка или точки его роста и т. д. Судьба образовавшихся полиплоидных клеток зависит от их конкурентоспособности по сравнению с диплоидными. Для получения полиплоидных особей селекционеру приходится применять в этих случаях специальные приемы расхимеривания. Доля полученных такими способами полиплоидных особей в зависимости от вида растения колеблется от нескольких до 30—40%, достигая в лучшем случае 50%. Однако не всегда и не у всех видов, пользуясь такой методикой, можно получать полиплоидные особи [61].

Характерная особенность культуры in vitro клеток и тканей растений — наличие в ней полиплоидных и гетероплоидных клеток, число которых увеличивается с возрастом культуры. Цитогенетическая нестабильность ее объясняется, по-видимому, целым комплексом факторов, таких как действие компонентов среды, влияние продуктов метаболизма, гетерогенность исходного материала, нарушение коррелятивных связей при выделении первичного эксплантата из растений [19]. Эту особенность можно использовать для получения полиплоидных клеточных клонов и полиплоидных растений [8, 9, 46, 48], в частности, создавать фертильные амфидиплоиды при культивировании тканей бесплодных гибридов [16]. Спонтанно возникающие в каллусной культуре полиплоидные формы также могут быть использованы. Так, из каллуса пеларгонии сорта *Rober s. Lemon Rose* спонтанно возникла высокополиплоидная форма *Velvet Rose*, характеризующаяся улучшенными декоративными качествами [62].

На практике для создания полиплоидных растений в культуре in vitro часто с успехом применяют обработку суспензии клеток колхицином [39]. Найти практическое применение может и получение в культуре ткани триплоидных растений из эндосперма [63].

С разработкой Коккингом в 1960 г. метода энзиматического получения больших количеств клеток растений, лишенных своей жесткой пектоцеллюлозной оболочки—изолированных протопластов, а также открытия ПЭГ-агента, с высокой эффективностью сливающего изолированные протопласты вместе, появилась реальная возможность конструирования растительной клетки по желанию исследователя. Этого можно достичь различными способами: слиянием изолированных протопластов, в результате чего возникают гибридные клетки или цибриды, то есть клетки, содержащие одно ядро и смешанную цитоплазму; введением в изолированные протопласты различных клеточных органелл—ядер, отдельных хромосом, хлоропластов, а также микроорганизмов; использованием фагов, фитовирусов, плазмид для включения гетерологичной ДНК; включением чужеродной ДНК с помощью механизма трансформации.

Уже намечаются конкретные подходы к практическому применению соматической гибридизации растений путем слияния изолированных протопластов. Используя уникальную особенность растительной клетки, ее тотипотентность, из гибридных клеток стали получать целые растения с новыми свойствами.

Именно в получении новых гибридных растений в первую очередь виделось будущее метода слияния изолированных протопластов. Однако этот путь оказался не таким простым, как представлялось вначале. После получения Карлсоном в 1972 г. [30] первого межвидового соматического гибрида между *Nicotiana glauca* и *N. langsdorffii* лишь через несколько лет появились сообщения об успешном получении новых межвидовых гибридов [33, 59].

Усовершенствование методик привело к повышению частоты гетерологических слияний, частоты делящихся клеток и регенерировавших из каллуса растений; были отработаны различные селективные системы. Все это позволило добиться дальнейших успехов в соматической гибридизации растений.

Глеба и Хофман [37] получили межтрибный гибрид *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh и *Brassica campestris* L., который нельзя получить половым путем. Мельхерс с соавт. сообщили о создании картофеле-томатного соматического гибрида при слиянии изолированных протопластов *Lycopersicon esculentum Mill* и *Solanum tuberosum* L. [45], у которого часть гибридных растений-регенерантов по своим признакам уклонялись в сторону томата, а часть—в сторону картофеля. Однако клубней эти гибриды не образовывали. Совсем недавно удалось создать картофеле-томатные гибриды при слиянии изолированных протопластов картофеля с протопластами томатов двух сортов, которые образовывали клубни [59]. Дальнейшая работа в этом направлении может привести к появлению совершенно новых форм растений, обладающих целым рядом хозяйственно-ценных признаков.

Методом слияния изолированных протопластов целесообразно получать гибридные растения не только в случае нескрещиваемости партнеров половым путем, но и тогда, когда половая гибридизация между ними возможна, так как при соматической гибридизации в гибридной клетке сочетаются не только геномы, но и цитоплазмоны обоих партнеров, что невозможно при половой гибридизации. В связи с признанием роли цитоплазматических генов в становлении ряда признаков у растений наличие в гибридной клетке цитоплазмы обоих родителей может иметь определенное практическое значение.

При слиянии изолированных протопластов *S. tuberosum* и *S. chaconesne* Bitt Бутенко и Кучко [2] получили первый и единственный в мире соматический гибрид между культурным и диким видами картофеля. Он характеризуется высокой устойчивостью к вирусу *У* в отличие от родительских форм и полового гибрида, которые были к нему неустойчивы. Соматический гибрид отличается мощным развитием надземной части и промежуточным характером хозяйственно-ценных признаков, что позволило вовлечь его в практическую генетико-селекционную работу.

При слиянии изолированных протопластов двух партнеров, ядра одного из которых инактивированы, можно передать цитоплазматические гены, например, гены ЦМС, другому партнеру [68]. Обычными методами этого можно достичь лишь в результате длительной рекуррентной гибридизации.

Кроме того, даже обычные растения-регенеранты, полученные из протопластов, характеризуются большим разнообразием форм [26, 65], среди которых нередки такие, которые обладают хозяйственно-ценными признаками [7, 60], в том числе устойчивостью к фитопатогенам [60]. В настоящее время растения-регенеранты получены из изолированных протопластов многих сельскохозяйственных культур—картофеля, томатов, рапса, капусты, люцерны, спаржи, цитрусовых [7, 28, 60].

Перспективность работы с изолированными протопластами не требует доказательств. Уже сейчас для картофеля, например, Венцел с соавт. [67] разработал аналитическую схему селекции, основанную на методах андрогенетического получения гаплоидов и их парасексуальной гибридизации. Дальнейшие успехи в этой области во многом будут зависеть от создания, с одной стороны, новых, еще более эффективных методик, позволяющих получать из изолированных протопластов каллусную культуру, и индуцировать в ней морфогенез, и, с другой стороны, методик, позволяющих получать с высокой частотой гетерологичные слияния и затем отбирать созданные таким образом гибридные клетки.

В борьбе за повышение урожайности сельскохозяйственных культур методы in vitro можно использовать не только для создания новых форм и сортов, но также и для получения оздоровленного посадочного материала, что очень важно для вегетативно размножаемых культур.

Остановимся на оздоровлении посадочного материала методом культуры верхушечной меристемы. Этот метод основан на экспериментально установленном факте уменьшения концентрации вируса по направлению к точке роста. Уайт в 1934 г. установил отсутствие виру-

са в кончиках корней томатов, зараженных ВТМ, путем инокуляции *N. glutinosa L.* тканями точек роста. Подобные результаты были получены также Лимассэ и Корнюэ при изучении стеблевых верхушек табака, зараженного ВТМ.

Впервые возможность выращивания здоровых растений картофеля из верхушечных меристем проростков клубней, зараженных вирусами X, Y и A, показали Морель и Мартин в 1955 г. [47]. Культивируя изолированную верхушечную меристему в стерильных условиях на специальных питательных средах, получают здоровые растения, которые в первый год выращивают в условиях теплицы с последующей пересадкой их в поле. К настоящему времени в различных странах некоторые культуры, в том числе многие ценные сорта картофеля, оздоровлены именно таким методом.

Оздоровленный методом культуры меристемы посадочный материал дает обычно более высокие урожаи, чем оздоровленный методом визуального отбора. Это подтверждается и нашими опытами, проведенными с картофелем сорта Истринский на экспериментальной базе «Горки Ленинские» ВНИИ прикладной молекулярной биологии и генетики (ВНИИПМБиГ) и на двух сортоучастках системы Госсети по сортоиспытанию МСХ СССР (табл. 1).

Таблица 1. Урожай клубней картофеля сорта Истринский в зависимости от способа оздоровления

Метод оздоровления	Экспериментальная база «Горки Ленинские»		Звенигородский сортоучасток		Дмитровский сортоучасток	
	ц/га	% к контролю	ц/га	% к контролю	ц/га	% к контролю
Визуальный отбор	304	100.0	256	100.0	319	100.0
Культура апикальных меристем	350	118.4	314	112.3	364	111.1
$НСР_{05}$	31	8.9	26	9.0	31	8.9

Повышение урожайности оздоровленных методом культуры меристемы растений картофеля может достигать 30% и более.

Несмотря на значительный экономический эффект от использования посадочного материала, оздоровленного таким методом, этот прием еще не нашел широкого применения в сельскохозяйственном производстве.

Чтобы сделать систему семеноводства картофеля на безвирусной основе более технологичной и значительно удешевить ее, в 1978 г. во ВНИИПМБиГ впервые был разработан эффективный метод индукции клубнеобразования in vitro у картофеля [11]. Таким образом, впервые была разработана теория и практика индукции направленного органогенеза In vitro, что явилось новым направлением в клеточной биотехнологии растений.

Получение жизнеспособных микроклубней непосредственно в пробирках позволило: исключить возможность перезаражения на всех этапах получения безвирусного семенного материала; сохранить его в те-

чение всего осенне-зимнего периода без дополнительных пересадок, создав своего рода «банк» оздоровленных ценных сортов картофеля; упростить и удешевить пересылку семенного материала; ускорить селекционный процесс, дав возможность в первый же год получить в пробирке оздоровленный материал в виде микроклубней; исключить из системы безвирусного семеноводства картофеля самый дорогостоящий и трудоемкий этап — теплицу, требующую дополнительных капитальных вложений на строительство, освещение и подогрев; удвоить урожай и количество клубней с одного куста по сравнению с применяемым до этого методом размножения пробирочными растениями (табл. 2).

Таблица 2. Влияние метода получения посадочного материала на урожайность картофеля сорта Истринский (вегетационный опыт 1980 г.)

Посадочный материал	Урожай на сосуд	
	количество клубней	Масса клубней, г
Пробирочные растения	7.38	161.64
Клубни, полученные в пробирке	15.80	305.87
Клубни, полученные после 1 вегетации в почве пробирочных растений	11.65	314.75

Начиная с 1980 г. на экспериментальной базе «Горки Ленинские» ВНИИ прикладной молекулярной биологии и генетики изучалась возможность получения оздоровленного посадочного материала картофеля при посадке в открытый грунт клубней, полученных в пробирках. В результате полученных за 4 вегетации данных установлена принципиальная возможность создания жизнеспособного, оздоровленного посадочного материала картофеля пробирочными клубнями путем их посадки непосредственно в открытом грунте.

Метод культуры меристемы in vitro наряду с такими методами культуры тканей, как образование придаточных побегов и органов непосредственно из клеток трансплантата, регенерация растений в каллусе, может с успехом применяться и для размножения ценных сельскохозяйственных культур [6]. Размножение в культуре in vitro имеет много преимуществ по сравнению с обычными методами. Например, у картофеля за 2 года суммарный коэффициент размножения может составить $3 \cdot 10^9$ [20], т. е. быть гораздо выше, чем при традиционных способах. С помощью этого метода можно поддерживать рост растений круглый год. При размножении in vitro тысячи растений в пробирках размещаются на небольшой площади. Одновременно происходит оздоровление растений от фитопатогенов.

По прогнозам [51], методы клеточной инженерии будут играть с каждым годом все большую роль и начиная с девяностых годов нашего столетия начнут резко повышать эффективность сельскохозяйственного производства, играя роль основного рычага во всех мероприятиях, направленных на повышение урожая.

Установлено, что листовая поверхность большинства растений утилизирует от 1 до 3% физиологически активной радиации солнца; рабо-

ты по повышению эффективности фотосинтеза должны значительно увеличить этот коэффициент. Содержание белка в сельскохозяйственных культурах не достигает необходимой нормы—ставится задача поднять содержание белка у важнейших сельскохозяйственных культур. Селекционеры надеются выработать у растений иммунитет или толерантность к болезням и вредителям, которые уничтожают сегодня в среднем 3—35 процентов урожая. Они рассчитывают также выработать у сельскохозяйственных растений устойчивость к засоленности почвы, гербицидам, засухе, к температурным стрессам.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Бутенко Р. Г.* С.-х. биол., *14*, 3, 306—315, 1979
2. *Бутенко Р. Г., Кучко А. А.* ДАН СССР, *247*, 2, 491, 1979
3. *Вавилов Н. И.* Генетика на службе социалистического земледелия. 32—56. М., 1966
4. *Давоян Э. И.* В кн.: Тканевые и клеточные культуры в селекции растений. 23—31. М., 1979.
5. *Жуковский П. М.* В кн.: Полиплоидия и селекция. 5. М—Л., 1963
6. *Катаева Н. В., Бутенко Р. Г.* Клональное микроразмножение растений. М., 1983
7. *Кучко А. А., Бутенко Р. Г., Витенков В. А., Свертока В. Е.* В кн.: IV съезд генетиков и селекционеров Украины. 209—211. Киев, 1981
8. *Лунева М. З., Бутенко Р. Г., Поддубная-Арнольди В. А.* В кн.: Полиплоидия и селекция. 344. Минск, 1972.
9. *Марьюшина И. Я., Внучкова В. А.* В кн.: Материалы 4-го Всесоюзн. совещ. по полиплоидии. 77—78, Киев, 1975.
10. *Мосолова А. В.* Методические указания по регенерации и размножению люцерны использованием культуры тканей, клеток и протопластов. М., 1980
11. *Морозова С. Е., Мелик-Саркисов О. С.* Физиол. раст., *25*, 2, 373—378, 1978
12. *Нитш Й., Венцель Г.* Гаплоиды в селекции растений. М, 1980
13. *Семенова И. В., Рубан Э. В., Киселева С. П.* В кн.: Тез. докл. Всесоюзн. конф. «Проблемы и пути повышения устойчивости растений к болезням и экстремальным условиям среды в связи с задачами селекции». 4, 32—33. Л., 1981.
14. *Суханов В. М., Тырнов В. С.* В кн.: Гаплоидия и селекция. 99—109, М., 1976.
15. *Тарасенко Н. Д., Скворцов Е. П., Лаптев Ю. П.* В кн.: Генетика картофеля. 140—156. М., 1972
16. *Терновский М. Ф., Бутенко Р. Г., Моисеева М. Е.* Генетика, *8*, 1, 38, 1972.
17. *Трускинов Э. В.* В кн.: Тез. докл. Всесоюзн. конф. «Проблемы и пути повышения устойчивости растений к болезням и экстремальным условиям среды и связи с задачами селекции». 4, 71—72, Л., 1981.
18. *Туманов И. И., Бутенко Р. Г., Оголовец И. В., Сметюк В. В.* Физиол. раст., *24*, 5, 895—900, 1977.
19. *Фролова Л. В.* В кн.: Культура клеток растений. 5—16. М., 1981.
20. *Хромова Л. М.* В кн.: Тез. докл. III Всесоюзн. конф. по культуре клеток растений. 138—139. Абовян, 1979.
21. *Хромова Л. М., Седнина Г. В., Бутенко Р. Г.* и др. В кн.: Тез. докл. Всесоюзн. конф. «Проблемы и пути повышения устойчивости растений к болезням и экстремальным условиям среды и связи с задачами селекции». 4, 54—55. Л., 1981
22. *Шамина З. Б.* В кн.: Культура клеток растений. 124—136. М., 1981
23. *Behnke M.* Theoret. appl. Genet., *55*, 2, 69—71, 1980
24. *Behnke M.* Z. Planzenzucht., *85*, 3, 254—258, 1980.
25. *Behnke M.* Theoret. appl. Genet., *56*, 151—152, 1980.
26. *Bidney D. L., Shepard J. F.* Biotechnol. Bioengg., *23*, 12, 2691—2701, 1981
27. *Bretell R. I. S., Ingram D. S.* Biol. Rev. Cambr. Phil. Soc., *54*, 3, 329—345, 1979
28. *Butenko R. G.* Intern. Rev. Cytol., *59*, 323—373, 1979.
29. *Carlson P. S.* Science, *193*, 4260, 1366—1368, 1973

30. *Carlson P. S., Smith H. H., Dearing R. D.* Proc. Nat. Acad. Sc. (US), *69*, 2292–2294, 1972.
31. *Chase S. S.* Bot. Rev., *35*, 2, 117–167, 1969.
32. *Coleman R. E.* Report ARS, USDA, 38, 1970.
33. *Dudits D., Hadlaczky Gy., Levi E. et al.* Theoret. appl. Genet., *52*, 127–132, 1977.
34. *Flores H. E., Kaur-Sawhney R., Galston A. W.* Adv. in Cell Culture, 1, 241–275, 1981.
35. *Gengenbach B. C., Green C. E., Donovan C. M.* Proc. Nat. Acad. Sc. (US), *74*, 5113–5117, 1978.
36. *Gleba Yu. Yu.* Naturwissenshaften, *65*, 3, 158–159, 1978.
37. *Gleba Yu. Yu., Hoffmann F.* Planta, *149*, 112–117, 1980.
38. *Grosshoff P. M., Doy C. H.* Planta, *107*, 161–170, 1972.
39. *Heinz D. J., Mee G. W.* Crop Sc., *10*, 6, 693, 1970.
40. *Jones L. E., Hildebrant A. S., Riker A. J., Wu J. H.* Am. J. Bot., *47*, 468–475, 1960.
41. *Kao K. N., Michayluk M. R.* Planta, *126*, 2, 105–110, 1975.
42. *Kruse A.* Hereditas, *77*, 2, 219–224, 1974.
43. *Larkin P. J., Scowcroft W. R.* Theoret. appl. Genet., *60*, 4, 197–214, 1981.
44. *Maliga P., Lazar G., Svab Z., Nagy F.* Molec. Gen. Genet., *119*, 267–272, 1976.
45. *Melchers G., Saccistan M. D., Holder A. A.* Carlsberg Res. Communicat., *43*, 203–218, 1978.
46. *Mitra J., Steward F. C.* Am. J. Bot., *48*, 5, 358–368, 1961.
47. *Morel G., Martin C.* C. R. Sc. Acad. Agr. Fr., *41*, 472–475, 1955.
48. *Murashige T., Nakono R.* J. Hereditas, *57*, 111, 1966.
49. *Nishi T., Matsuoka S.* Japan J. Genetics, *44*, 341–346, 1969.
50. *Nitzsche W., Hennig L.* Z. Pflanzenzucht., *77*, 1, 80–82, 1976.
51. *Philips R. L.* In: Genet. engg. plants: Agr. Perspect. Prop. Symp., 15–19, Aug. 1982, N. Y., London, 453–465, 1983.
52. *Phillips G. C., Collins G. B., Taylor N. L.* Theoret. appl. Genet., *62*, 1, 17–24, 1982.
53. *Power J. B., Frearson E. M., Hayward C. et al.* Nature, *263*, 5577, 500–502, 1976.
54. *Radin D. N., Carlson P. S.* Genet. Res. Cambr., 32, 85–89, 1978.
55. *Raveh D., Huberman E., Galun E.* In Vitro, 9, 216, 1973.
56. *Raveh D., Galun E.* Z. Pflanzenphysiol., *76*, 1, 76, 1975.
57. *Schenk G.* Nachrbl. Pflanzenschutz in DDR, 2, 38–40, 1983.
58. *Sharma D. R., Crowdhury J. B., Uma Ahuja, Dhankhar B. S.* Z. Pflanzenzucht. *85*, 248–253, 1980.
59. *Shepard J. F., Bidney D., Barby T., Kemble R.* Science, *219*, 4586, 683–688, 1983.
60. *Shepard J. F., Bidney D., Shahin E.* Science, *208*, 4, 17–24, 1980.
61. *Sisodia N. S.* Ann. Rep. British West Indes Central Sugar Cane Breed Station, 32, 30, 1965.
62. *Skrivin R. M., Janick J.* Hort Sc., *11*, 1, 61–62, 1976.
63. *Srivastava P. S.* Z. Pflanzenphysiol., *69*, 3, 270–278, 1973.
64. *Sunderland W., Wicks F. M.* J. exper. Bot., 22, 70, 213–226, 1971.
65. *Thomas E., Bright S. W. J., Franklin J. et al.* Theoret. appl. Genet., *62*, 1, 65–68, 1982.
66. *Wangenheim K.* Z. Pflanzenzucht., *47*, 172, 1962.
67. *Wenzel G., Schieder O., Przewozny T. et al.* Theoret. appl. Genet., *55*, 2, 49–55, 1979.
68. *Zelcer A., Avtc D., Galun E.* Z. Pflanzenphysiol., *90*, 397–407, 1978.
69. *Zubkova M., Sladky Z.* Biol. Plant., *17*, 4, 276–280, 1975.

Поступило 5.V 1986 г.