

Геномная изменчивость соматических клеток растений.

3. Каллусообразование *in vitro*

В. А. Кунах

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

Сделан обзор данных об особенностях каллусообразования in vitro. Проанализированы как внешние, так и внутренние условия и факторы, влияющие на дедифференциацию клеток. Определяющим в этих процессах является взаимодействие генотип — среда, существенный момент в котором — наличие генетической компоненты в реакции растения, его клеток на травму и во многих случаях — на экзогенные регуляторы роста. Рассмотрены два принципиально отличных способа индукции каллусообразования — индукция экспрессии генов, определяющих каллусообразование в тех случаях, когда это явление генетически детерминировано, и индукция фенокопий признака «способность к каллусообразованию».

Современная биотехнология растений основана на использовании результатов экспериментальных воздействий на уровне отдельных клеток. Это, как правило, клетки, выращиваемые в изолированных условиях. Введение клеток в культуру *in vitro* — это, по существу, создание новой биологической системы. Новизна этой системы заключается прежде всего в том, что в ней структурные частички целостного организма — клетки, выполняющие только определенные функции, становятся в конечном счете отдельными организмами, способными к автономному развитию. Культивируемые клетки высших растений представляют уникальную, не имеющую прямых аналогий в природе, развивающуюся и эволюционирующую клеточную популяцию.

Анализ особенностей геномной изменчивости клеток при их выращивании в изолированных культурах начнем с рассмотрения условий и факторов каллусообразования как первого этапа введения растительных клеток в культуру *in vitro*.

Каллусообразование — это результат дедифференциации и активного деления и роста дедифференцированных неорганизованно растущих клеток, возникающее в природе при ранениях [1]. Неудач-

ные попытки культивирования в изолированных условиях специализированных клеток растений привели к ошибочному убеждению, что к каллусообразованию способны только меристематические клетки [2]. В процессе дальнейшего совершенствования метода культуры тканей, подбора оптимальных условий культивирования, составов сред и необходимых стимуляторов роста накапливались данные, свидетельствующие о том, что каллусы могут образовывать любые клетки растений — от паренхимы листьев, стеблей, флоэмы корнеплода, лепестков и трихом цветка до эндосперма и пыльцы. Вместе с тем дифференцированные клетки все же не всегда способны образовывать каллус. Это явление особенно часто наблюдается у злаков. В качестве характерных примеров можно привести результаты экспериментов с листовыми эксплантами 15 сортов мягких и твердых пшениц и 5 диких видов пшеницы [3]. Все испытанные авторами генотипы обладали способностью к образованию каллуса из незрелых оснований листьев. Из дифференцированных клеток листа каллус не был получен ни в одном случае. Интересные результаты получены также при введении в культуру тканей кукурузы сорта «Sepesa 60» [4]. Авторы, используя в качестве эксплантов участки листьев двух-, трех- и четырехнедельных растений, установили, что к

пролиферации в культуре способны только участки, вычлененные из определенной зоны, находящейся у основания листа. Размер этой зоны около 40 мм, и она смещается с возрастом в сторону более молодых листьев. Например, такая зона у двухнедельных проростков была у оснований третьего и четвертого листьев, у трехнедельных — четвертого и пятого листьев, у четырехнедельных — пятого и шестого.

В настоящее время накоплено большое количество данных, свидетельствующих о том, что способность к каллусообразованию, темп и тип роста изолированных тканей, их способность к различным типам морфогенеза зависят не только от состава питательной среды, условий выращивания (освещенность, температура, длительность субкультуры и др.) и возраста растений-доноров, но и от физиологического состояния этих растений, сезона, условий их выращивания или произрастания, в том числе от погоды, от стадии развития исходного органа, тканевой принадлежности экспланта [3—12], от его размера [13, 14] и в ряде случаев даже от его ориентации на питательной среде [15, 16], некоторых специфических особенностей, например, от удельной плотности [17] и скорости прорастания семян, служащих источником эксплантов [18], от наличия в экспланте эндофитных бактерий [19], условий хранения покоящегося исходного материала, например, клубней картофеля [20], расположения исходного колоска в колосе при использовании пыльников пшеницы [21]. У культивируемых пыльников риса даже при выращивании растений в одинаковых условиях и отборе цветков на одной и той же стадии частота образования каллуса колебалась от цветка к цветку и эти колебания были неслучайными [22]. У различных сортов и гибридов ячменя способность к образованию каллуса из микроспор также имела значительные различия между колосьями, причем эти различия наследовались и именно они были основным источником изменчивости изучаемого признака [23]. Однако имеются данные и о том, что подобная зависимость может отсутствовать. Например, у райграса *Lolium multiflorum* не наблюдали корреляции по частоте каллусообразования между эксплантами меристем, молодых листьев и корней [24].

Следует особо подчеркнуть, что попытки получения каллусных тканей из узкоспециализированных органов и тканей, таких, например, как эндосперм и пыльца, показали, что к каллусообразованию способны клетки, находящиеся только на определенной стадии развития. У многих видов растений каллус можно получить из пыльцы, находящейся на двухъядерной стадии [25].

Существенное влияние на процессы каллусообразования, потенциальные возможности каллуса к дальнейшему пассируемому росту и разным типам морфогенеза оказывает видовая принадлежность растения. В частности, выявлены значительные отличия по указанным признакам в культуре пыльников свеклы, где дикие виды (*Beta macrorhiza*, *B. lomatogona*, *B. corolliflora*, *B. trigyna*) характеризовались более низкой частотой каллусообразования по сравнению с пыльниками сахарной и кормовой свеклы [26]. Различия в каллусообразующей способности установлены также между сортами люцерны, относящимися к разным видам — *Medicago varia* и *M. borealis* [27], между твердой и мягкой пшеницей [16], между различными образцами овса, где гексаплоидные виды (*Avena ludoviciana*, *A. fatua*, *A. nodipilosa*, *A. sativa*) и тетраплоидный (*A. barbata*) характеризовались высокой способностью к каллусообразованию, а диплоидный *A. strigosa* и тетраплоидный *A. magna* — низкой [28]. Подобное явление обнаружено у хлопчатника и актинидии, но у них диплоидные виды формировали каллус интенсивнее, чем полиплоидные [29—31]. Отличия установлены и между близкородственными видами, например, у дикой и культурной гречихи [32], весеннецветущих видов рода *Crocus* [12].

При изучении каллусообразования и регенерационной способности молодых листочков 47 генотипов арахиса отличия были установлены и между подвидами. Например, сорта, относящиеся к ботаническому типу *Virginia* (подвид *hypogaea*), значительно отличались от таковых, относящихся к типам *Valencia* и *Spanish* (подвид *fastigiata*) [33]. Сорта риса подвидов *japonica* и *javanica* характеризовались высокой каллусообразующей способностью, а сорта подвида *indica* и гибриды *japonica* × *indica* — слабой способностью [34].

Не менее разительные отличия установлены и внутри вида для многих высших растений, представителей как голосеменных, так и покрытосеменных, в том числе однодольных и двудольных. Одинаковые по возрасту и тканевой принадлежности первичные экспланты, вычлененные из растений, выращиваемых в одинаковых условиях, отличались в зависимости от исходного генотипа (сорта, линии) по частоте каллусообразования. При этом размах частоты индукции каллусообразования может колебаться от 0 до 100 % у разных растений [7, 23, 35—47].

Например, в опытах с кукурузой различий в способности к каллусообразованию у различных подвидов мы не наблюдали. Гибридный материал превосходил по интенсивности каллусообразования

инбредные линии. Некоторые мутантные линии еще более превосходили по этому признаку исходные линии (почти в 3 раза) и даже гибридный материал [48]. Следовательно, на примере кукурузы было показано наличие экспериментальных мутантных форм растений, характеризующихся повышенной способностью к каллусообразованию. Подобные мутанты были выделены и у других видов растений, например, у гороха [39, 49] и ячменя [36]. Сведения о том, что гибриды превышают сорта и чистые линии по способности образовывать каллусы, получены и другими исследователями. В частности, у яровой пшеницы гибриды превышали в 3—6 раз сорта по этому признаку [50].

Существенное влияние на процессы каллусообразования может оказывать уровень плоидности исходного растения [28, 30, 51—55]. При этом показатели каллусообразования (частота индукции и темп роста каллуса) в одних случаях были выше у аутотетраплоидных по сравнению с диплоидными, как это показано для пажитника сеного [55] и сахарной свеклы [56]. В других случаях интенсивность образования каллусной ткани, скорость ее роста и морфогенетическая способность ухудшались с увеличением уровня плоидности исходных форм, например, у картофеля [11], райграса многоукосного [24], дурмана [51, 52], пшеницы [53], табака [54, 57].

Изучая влияние уровня плоидности на способность к каллусообразованию, мы использовали диплоидные растения табака *Nicotiana tabacum* сортов Дюбек 44 и Самсун и полученные от них гаплоиды [58], гаплоид, диплоид и тетраплоид томата, а также диплоидное и тетраплоидное растение гаппопуса. У табака на участках листьев от диплоидных растений каллус обнаруживали через 6—8 дней после их изоляции, а от гаплоидных растений — на 12—15-е сут. Интенсивность роста каллусов от диплоидов также была более высокой. В случае использования сердцевинной паренхимы результаты были иными. На эксплантах от гаплоида каллус образовывался чаще, чем на эксплантах от диплоидного растения: частота каллусообразования была 91,8 и 58,3 % соответственно. У томатов и гаппопуса существенной зависимости между плоидностью исходного материала и интенсивностью каллусообразования установлено не было. У гаппопуса экспланты от тетраплоидного растения образовывали каллус в те же сроки и столь же интенсивно, как и от диплоидного растения.

Подобные результаты получены и другими исследователями, в частности, на примере диплоидных линий земляники *Fragaria vesca* и ее тетраплоидных аналогов. По такому признаку, как доля

калусообразующих эксплантов, взятых от растений на стадии отрастания надземных частей, тетраплоиды превышали соответствующие диплоидные линии, а при использовании эксплантов, взятых на стадии бутонизации и цветения, диплоидные линии превышали по этому признаку соответствующие тетраплоиды [59]. В то же время сорта и отдельные гибриды сливы, в отличие от сортов яблони, груши, вишни, имели низкую способность к каллусогенезу независимо от их уровня плоидности (изучали диплоидные, тетраплоидные и гексаплоидные сорта) [60].

На примере пшеницы был проведен анализ влияния отдельных хромосом на процессы индукции, роста и способности к регенерации каллусных тканей. С использованием 24 анеуплоидных линий мягкой пшеницы сорта Чайниз Спринг по хромосомам генома В было установлено, что скорость роста каллуса снижалась только при отсутствии длинного плеча хромосомы 6В [61]. Замена хромосомы 4В гомологичными хромосомами из других сортов пшеницы положительно влияла на процессы индукции и роста каллусных тканей [42, 62]. Положительный эффект на образование каллуса в культуре пыльников Чайниз Спринг оказывало и добавление к кариотипу этой пшеницы четвертой хромосомы ржи сорта Империял. Как установили авторы, эта хромосома в отличие от шести других хромосом ржи содержит факторы, значительно повышающие образование каллусов [63].

В ряде экспериментов показано, что ткани растений, регенерированных из культивируемых *in vitro* клеток, обладают повышенной способностью к каллусообразованию и редифференцировке [64, 65]. Однако селективные преимущества и повышенные способности к каллусообразованию уже культивируемых ранее *in vitro* родоначальников проявляется не всегда (см., например, [66]).

Большинство экспериментов свидетельствует о том, что у растений многих видов способность к каллусообразованию генетически детерминирована, характеризуется высокой наследуемостью и может иметь гетерозисный эффект [7, 35, 47, 67—74]. Например, у томатов рост каллуса на первичных эксплантах и рост полученных каллусных культур имели наследуемость 0,47 и 0,78 соответственно [75]. Анализ наследования способности к каллусообразованию у риса показал, что этот показатель выше у группы сортов *japonica*, чем в группе *indica* [46]. Этот признак наследуется у риса как простой рецессив, обусловленный отдельным блоком генов; в определении данного признака аддитивные эффекты генов преобладают над доминированием [46, 72]. Подобные результа-

ты получены также на ячмене, где индукция каллуса и его дальнейший рост контролировались генами с аддитивным эффектом. Отмечено также проявление эпистаза, в частности, индукция каллуса полностью подавлялась доминантным геном определенного генотипа [76, 77]. Генетический анализ у голубиногороха показал наличие гетерозисного эффекта, а также аддитивного и неаддитивного влияния генов на рост каллусов [73]. В генетическом контроле индукции каллусов и эмбрионидов из пыльников гексаплоидных форм яровых тритикале основная роль принадлежит сверхдоминированию [78]. У кукурузы развитие каллуса *in vitro*, образование эмбрионного каллуса и способность каллуса к регенерации растений обусловлены в основном аддитивными эффектами генов, хотя у отдельных линий значимыми оказались эффекты доминирования, эпистаза и цитоплазматические факторы [79—81]. Инициация каллуса из незрелого эндосперма кукурузы была более активной при наличии в геноме специфических аллелей, в частности, при наличии аллеля *ash2* [82].

Установлено, что у редиса способность к каллусообразованию определяется моногенно [70, 83]. Видимо, моногенно регулируется и темп роста каллуса. Например, у ряда сортов риса признак «темпа роста» контролируется моногенно, причем доминантные аллели подавляли рост, а сорта с рецессивными генами характеризовались более мощным ростом каллуса [47].

Имеются данные и о том, что способность к каллусогенезу зависит не только от генома, но и от цитоплазмона. При этом в одних случаях роль цитоплазматических факторов охарактеризована как минимальная, например, у риса [46], в других случаях их роль может быть существенной, например, у красного клевера [68], кукурузы [80, 81], пшеницы *Triticum aestivum* [71, 84, 85].

Существует мнение, что процессы дедифференциации при каллусогенезе определены и эволюционно закреплены и не зависят от конкретного генотипа, а проявляются или не проявляются в зависимости от сложившейся метаболической ситуации и конкретных внешних условий [40, 86]. По данным других исследователей, существует генетическая компонента в реакции роста каллуса на добавление извне фитогормонов и на смену условий выращивания [51, 67, 87]. Например, у фасоли *Phaseolus vulgaris* чувствительность к ауксинам была высокой, у *Ph. acutifolius* — низкой, а разные генотипы *Ph. lunatus* отличались по чувствительности к разным формам цитокининов [88, 89]. У дитетраплоидных видов хлопчатника рода *Gossypium* — представителей трех геномов установлена

связь гормонозависимости каллусогенеза с генотипом: при использовании разных регуляторов роста ауксинового и цитокининового типа выявлены значительные различия между видами по способности образовывать каллус на разных составах питательных сред, что, по мнению авторов, определяется генотипом [29]. Для различных генотипов сахарной свеклы необходимым условием каллусообразования на участках молодых листьев является наличие в среде фитогормонов: для одних генотипов — ауксина, для других — цитокинина, для третьих — либо ауксина, либо цитокинина [90].

Подобные результаты получены при изучении влияния эпигеномной изменчивости на процессы каллусообразования. Например, у *Euphorbia heterophylla* каллусообразование на участках гипокотилей проростков было ауксиннезависимым, а на участках корней — ауксинзависимым процессом [91]. У *Pennisetum purpureum* основания молодых листьев содержали больше фитогормонов, в частности, ИУК и АБК, чем средняя и апикальная зоны листьев. Эта базальная зона содержала много делящихся клеток и была способна к каллусогенезу лучше по сравнению с другими частями листа [92]. Видимо, в подобных случаях для определенных эксплантов некоторых растений одного лишь вычленения экспланта (его ранения) и переноса на питательную среду без регуляторов роста достаточно для активного каллусообразования. Это было показано, например, в наших исследованиях на гаплоапплусе [93], а также другими исследователями на примере лимона [94], петрушки садовой [95], цикория [96], сахарной свеклы [97]. В последнем случае листовые экспланты 14 линий сахарной свеклы из 16 изученных на среде без регуляторов роста формировали каллусную ткань с эффективностью от 25 до 100 % в зависимости от генотипа.

Для индукции каллусообразования у многих других видов растений необходимо наличие в питательной среде различных типов фитогормонов, иногда в больших дозах. Следовательно, в одних случаях каллусообразование детерминировано, по-видимому, генетически и индуцируется достаточно легко и сравнительно просто, в том числе и на питательных средах без фитогормонов, в других — каллусообразование является фенкопией признака, возникающего под влиянием экзогенных регуляторов роста. Возможно, этим и объясняются данные, свидетельствующие о том, что на оптимальных составах питательных сред (как правило, обогащенных различными стимуляторами роста) зависимость каллусообразования от генотипа исходного растения проявляется слабо, а на обед-

ненных составах сред она для многих видов растений достаточно высока, как это было показано нами для гороха [98] и кукурузы [48].

В основе описанных явлений могут быть отличия между исходными растениями по наличию и состоянию генов как влияющих на метаболизм фитогормонов, так и регулируемых гормонами. Например, у мягкой пшеницы хромосомы 4A и 4D имеют локус *Rht*, гены которого изменяют метаболизм гиббереллинов и ауксинов. Было установлено, что гены этого локуса достоверно влияли на рост каллуса и регенерацию, наблюдалось сильное взаимодействие между генами, содержанием 2,4-Д в среде и сортом [99]. В опытах других исследователей была показана зависимость процессов каллусообразования от содержания эндогенных фитогормонов в эксплантах незрелых зародышей пшеницы, которое у разных генотипов было разным. Авторы [100] считают, что именно баланс эндогенных фитогормонов является существенным фактором, влияющим на первичный каллусогенез. Подобные различия в содержании фитогормонов и зависимость интенсивности каллусообразования от их содержания показаны, как уже упоминалось, и при использовании различных зон молодых листьев *P. purpureum* [92]. В последнем случае, видимо, существенную роль играют эпигенетические отличия, сказывающиеся на гормональном балансе и гормональной компетентности клеток и тканей исходного экспланта.

Результаты изложенных и многих других, имеющих в литературе, экспериментальных данных свидетельствуют о том, что способность к каллусообразованию, прежде всего, гормонозависимое явление. Проведенный анализ позволил нам присоединиться к точке зрения авторов, считающих, что определяющим в индукции каллусообразования и в способности каллуса к дальнейшему росту и морфогенезу является взаимодействие генотип — среда, существенный момент в котором — наличие генетической компоненты в реакции клеток на экзогенные регуляторы роста и развития [35, 45, 51, 101—103]. Это взаимодействие основано, вероятно, на том, что компоненты питательной среды, в первую очередь, фитогормоны, условия вычленения экспланта и его выращивания могут оказывать влияние на экспрессию генов, определяющих каллусообразование (см., например, [40, 83, 104]). Схема такого взаимодействия была предложена в результате исследования клеточной дедифференциации при культивировании эксплантов листьев *N. tabacum* и *D. innoxia* [105].

Согласно этой схеме, для установления программы дедифференциации необходимыми услови-

ями являются травма и присутствие сахарозы, сенсibiliзирующие клетки к фитогормонам. После реактивации метаболизма появлению первых митозов предшествует синтез ДНК. В условиях *in vitro* определенную роль играют негормональные эффекторы перехода клетки из G₁- в S-период клеточного цикла, в частности, полиамины и их предшественники. Эти вещества способствуют образованию каллуса.

Однако, судя по накопленному фактическому материалу, далеко не все виды растений имеют гены, ответственные за каллусообразование. Видимо, поэтому в некоторых работах по введению в культуру *in vitro*, прежде всего, многих видов злаков значимого взаимодействия генотип — среда не обнаружено [45]. Высказанное предположение о регуляции экспрессии генов, определяющих индукцию и рост каллуса условиями культивирования, может быть справедливым, видимо, по отношению лишь к тем видам, которым свойственна эволюционно закрепившаяся способность образовывать раневой каллус. Такие растения в ответ на повреждение и перенос экспланта на искусственную питательную среду сравнительно легко образуют каллусную ткань. Виды, не образующие каллуса в природе, вводятся в культуру *in vitro*, особенно при использовании протопластов в качестве исходных (первичных) эксплантов, значительно труднее. Они требуют, как правило, специальных манипуляций, приводящих к появлению фенокопий признака «способность к каллусообразованию». Среди них использование эксплантов, вычлененных из онтогенетически молодых тканей с высокой митотической активностью и/или высоким содержанием эндогенных гормонов; использование мутантных форм растений с измененным в большинстве случаев гормональным статусом; введение в питательную среду высокоактивных стимуляторов роста, в частности, производных феноксиуксусной кислоты (чаще всего 2,4-Д); других специальных манипуляций и обработок исходного материала стрессовыми физическими и химическими факторами, зачастую изменяющими гормональный баланс (температура, освещение, преенкубация исходного материала в специальных питательных средах, облучение, магнитные поля, гравитация, химические мутагены, и др.); нетривиальных условий выращивания вычлененных эксплантов. Примером таких растений могут быть райграсс [106], малохромосомный злак зингерия *Zingera biebersteiniana* [107]; пшеница [3, 85], кукуруза [4, 48], *P. purpureum* [92], ряд сортов риса [43, 108], ячмень, тритикале [109], люцерна [110] и ряд других, преимущественно злаковых растений.

Однако даже перечисленные и другие манипуляции не всегда инициируют дедифференциацию клеток и ее результат — образование каллуса. Причиной ряда неудачных попыток индуцировать каллусообразование после различных воздействий и использования разных генотипов может быть, основываясь на гипотезе Бродского—Урываевой [111], исход «борьбы между пролиферативными и тканеспецифичными синтезами» в пользу тканеспецифичных. По-видимому, в ряде случаев в некоторых органах (клетках) существующая программа развития настолько консервативна, что она продолжает реализовываться даже в экстремальных условиях, и клетки «не переключаются» на новую программу — индукцию дедифференциации. Характерным примером здесь могут быть эксперименты по культивированию зародышей и семян лотоса, где независимо от состава среды зародыш в культуре *in vitro* показывал только один путь развития — эмбриогенез [112].

Заключение. Культура клеток высших растений — это уникальная экспериментально созданная биологическая система. Она представляет собой клоновую популяцию, роль организмов в которой осуществляют клетки, изначально запрограммированные на выполнение определенных структурных и функциональных задач как часть многоклеточного организма.

Введение в культуру *in vitro* предполагает дедифференциацию клеток исходного экспланта и их дальнейшее не ограниченное внутренними факторами размножение. При этом происходит выход клеток из-под влияния интегрирующих систем организма, радикально изменяются их функции и метаболизм. В этом процессе имеется несколько ключевых (критических) точек, прохождение которых определяет конечный успех в получении пассируемых культур. Существенную роль здесь играют как внутренние, так и внешние факторы, т. е. особенности генотипа исходных клеток и условия введения их в культуру *in vitro*.

В целом процесс получения пассируемых клеточных культур можно условно разделить на два этапа. Первый этап — это индукция каллусообразования, т. е. процессов дедифференциации и дальнейших делений дедифференцированных клеток. Второй этап — это отбор клеток, способных к длительному росту в условиях изолированной культуры на искусственных питательных средах и создание клеткам соответствующих условий для такого роста.

Способность к каллусообразованию у многих видов растений, прежде всего двудольных, — эволюционно закрепленная генетически детерминиро-

ванная реакция на травму, которая направлена на восстановление повреждений организма. Она обусловлена небольшим числом взаимодействующих генов, возможно, и моногенно (см. [83]). Определенную роль здесь могут играть и цитоплазматические факторы.

Проявление каллусообразующей способности *in vitro* зависит не только от генотипа растения, наличия определенных генов, но и от их состояния. Это выражается в том, что в аналогичных условиях экспланты от растений одного и того же вида в зависимости от возраста, физиологического состояния, условий выращивания растений, тканевой принадлежности экспланта и стадии его онтогенеза отличаются интенсивностью каллусообразования. Когда каллусообразование детерминировано генетически и клетки находятся в состоянии компетентности к индуцирующим факторам, этот процесс осуществляется легко — одного лишь вычленения экспланта и его переноса на питательную среду даже без фитогормонов достаточно для активной пролиферации клеток. В иных случаях для индукции каллусообразования необходимо применение специальных предобработок исходного материала, специфических условий выращивания экспланта, использование разных типов фитогормонов, стимулирующих в определенных условиях пролиферацию клеток. Обусловлено это, по-видимому, различиями между эксплантами в наличии и состоянии (компетентности) генов как определяющих метаболизм фитогормонов, так и регулируемых гормонами.

Основным в индукции каллусообразования является взаимодействие генотип — среда, существенный момент в котором — наличие генетической компоненты в реакции растения, его клеток на повреждение и во многих случаях — на экзогенные регуляторы роста. Это взаимодействие основано на том, что ранение (травма) при вычленении экспланта, компоненты питательной среды, прежде всего, фитогормоны и, вероятно, сахара, другие условия изолирования влияют на экспрессию генов, определяющих каллусообразование. У тех видов растений, которым не свойственно каллусообразование в природе, клетки в культуру вводятся значительно труднее, здесь в процессе индукции пролиферации клеток *in vitro* значимого взаимодействия генотип — среда, например, для некоторых злаков не обнаружено [45]. В этих случаях появление фенкопий признака «способность к каллусообразованию» может быть индуцировано у клеток онтогенетически молодых тканей и органов с высоким потенциальным уровнем пролиферативной активности.

Для индукции используется воздействие различными стрессовыми факторами, в первую очередь, высокими дозами экзогенных, как правило, синтетических стимуляторов деления и роста клеток. Здесь, по-видимому, существенную роль играет наличие компетентных клеток к гормонам, стимулирующим пролиферацию, или возникновение такой компетентности после стрессовых воздействий. Использование в качестве исходного материала мутантных и гибридных форм растений с измененным гормональным статусом в ряде случаев повышает вероятность и частоту индукции каллусообразования.

Индукция каллусообразования — это первый этап введения клеток в культуру *in vitro*. У ряда видов растений, например, у многих пасленовых первичный каллус сравнительно легко дает начало пассируемым культурам клеток, выращиваемым как на твердой питательной среде, так и в виде клеточных суспензий. В этих случаях для успешного роста требуется внести, да и то не всегда, коррективы в условия выращивания пассируемых культур. Чаще всего в питательной среде изменяют содержание регуляторов роста, иногда и минеральный состав среды. Питательная среда при этом, как правило, обдняется. Получение пассируемых культур, несмотря на его кажущуюся в некоторых случаях легкость, — процесс сложный и многоэтапный. Он предполагает адаптацию клеток к резко измененным условиям существования, формирование новой биологической системы, в которой клетки, выполняющие в организме лишь некоторые его функции, выполняют функции отдельных организмов, способных к автономному развитию. Это требует кардинальной перестройки как функций и метаболизма клеток, так и структуры клеточной популяции. Особенности этих процессов будут рассмотрены в последующих сообщениях.

В. А. Кунах

Геномна мінливість соматичних клітин рослин.

3. Калюсоутворення *in vitro*

Резюме

Зроблено огляд даних про особливості калюсоутворення *in vitro*. Проаналізовано як зовнішні, так і внутрішні умови та фактори, що впливають на дедиференціацію клітин. Визначальною у цих процесах є взаємодія генотип — середовище, де істотним моментом є наявність генетичної компоненти в реакції рослини, її клітин на травму і в багатьох випадках — на екзогенні регулятори росту. Розглянуто два принципово відмінні способи індукції калюсоутворення — індукція експресії генів, що визначають калюсоутворення у тих випадках, коли це явище генетично детерміноване, та індукція фенокопій ознаки «здатність до калюсоутворення».

V. A. Kunakh

Genome variability in plant somatic cells. 3. Callus formation *in vitro*

Summary

Literature data on the peculiarities of callus formation *in vitro* have been reviewed. Both internal and external conditions and factors contributing to cell dedifferentiation were analysed. Predetermining among these processes may be genotype-medium interaction the essential point of which provides presence of the genetic component in plant response, its cells to trauma and in many cases to exogenic growth regulators. Two principally differing ways for induction of callus formation — induction of gene expression in the cases when this phenomenon is genetically predetermined and induction of phenocopies for the trait «potential for callus formation» in other cases were examined.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кренке Н. П. Регенерация растений.—М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1950.—676 с.
2. White P. R. Controlled differentiation in a plant tissue culture // Bull. Torrey Bot. Club.—1939.—N 66.—P. 507—513.
3. Wernicke W., Milkovits L. Developmental gradients in wheat leaves — Response of leaf segments in different genotypes cultured *in vitro* // J. Plant Physiol.—1984.—115, N 1.—P. 49—58.
4. Wenzler H., Meins F. Mapping regions of the maize leaf capable of proliferation in culture // Protoplasma.—1986.—131, N 1.—P. 103—105.
5. Pei W., Yurong C. Влияние условий роста растений — доноров пыльников, на получение растений из пыльцы в культуре пыльников пшеницы // Acta genet. sinica.—1980.—7, N 1.—P. 64—71.
6. Hanning G. E., Conger B. V. Factors influencing somatic embryogenesis from cultured leaf segments of *Dactylis glomerata* // J. Plant Physiol.—1986.—123, N 1.—P. 23—29.
7. Давоян Э. И. Генетическая детерминированность процессов каллусообразования и индукции регенерантов в культуре тканей риса // Генетика.—1987.—23, № 2.—С. 303—310.
8. Chen M. H., Wang P. J., Maeda E. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Carica papaya* L. // Plant Cell Repts.—1987.—6, N 5.—P. 348—351.
9. Nehra N. S., Kartha K. K., Stushnoff C. Nuclear DNA content and isozyme variation in relation to morphogenetic of strawberry (*Fragaria ananassa*) callus cultures // Can. J. Bot.—1991.—69, N 2.—P. 239—244.
10. Christopher T., Prolaram B., Subhash K. Differential *in vitro* morphogenetic response in hypocotyl segments of *Capsicum annum* // Indian J. Exp. Biol.—1991.—29, N 1.—P. 68—69.
11. Subova D., Lengyel G. Kultivacia nezrelych anther vybratych druhov a klonov zemiaka na diploidnej a tetraploidnej úrovni // Genet. a zlecht.—1991.—27, N 4.—С. 293—294.
12. Чуб В. В., Власова Т. А., Бутенко Р. Г. Каллусогенез и морфогенез в культуре генеративных органов весеннецветущих видов *Crocus* L. // Физиология растений.—1994.—41, № 6.—С. 815—820.
13. Rybezynski J. J., Zduńczyk W. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in the genus *Secale*. 1. Somatic embryogenesis and organogenesis from cultured immature embryos of five wild species of rye // Theor. and Appl. Genet.—1986.—73, N 2.—P. 276—271.
14. Linacero R., Vazquez A. M. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of rye // Plant. Sci.—1990.—72, N 2.—P. 253—258.

15. Daniel G. Einfluss der Antherenausrichtung auf die Kallusbildung und Pflanzenregeneration bei Gerste (*Hordeum vulgare* L.) // Bayer. Landwirt. Jahrb.—1987.—64, N 7.—S. 863—871.
16. Кушнаренко С. В., Рахимбаев И. Р. Морфогенез в культуре тканей яровой пшеницы // Вест. АН КазССР.—1988.—№ 5.—С. 63—68.
17. Zapata F. J., Ella E. S. Specific gravity of the grain — a factor to consider in rice tissue culture // J. Plant Physiol.—1988.—132, N 3.—P. 294—297.
18. Coppens L., Vercuyse-Dewitte D., Gillis E. Influence of germination delay on callus induction from shoot meristems of barley (*Hordeum vulgare* L.) embryos // Ibid.—P. 383—384.
19. Garcia-Reina G., Robaina R., Tejedor M. et al. Attempts to establish axenic cultures and photoautotrophic growth of *Gelidium versicolor*, *Gracilaria ferox* and *Laurencia* sp. cell cultures // Algal. Biotechnol. Proc. 4th Int. Meet. SAA, Villeneuve d'asq. (15—17 Sept., 1987).—London; New York, 1988.—P. 111—118.
20. Ouraishi A., Rossignol-Bancilhon L., Nozeran R. Effet de l'origine du fragment sur la callogenese *in vitro* chez *Solanum tuberosum* L. var. «BF 15» // Ann. amelior. plant.—1979.—29, N 6.—P. 639—663.
21. Picard E., Buysier J. Nouveaux resultats concernant la culture d'antheres *in vitro* de ble tendre (*Triticum aestivum* L.). Effets d'un choc thermique et de la position de l'anthere dans l'epi // C. r. Acad. sci.—1975.—D 281, N 2—3.—P. 127—130.
22. Chaleff R. S., Stolarz A. Factors influencing the frequency of callus formation among cultured rice (*Oryza sativa*) // Physiol. Plant.—1981.—51, N 2.—P. 201—206.
23. Dunwell J. M., Francis R. J., Powell W. Anther culture of *Hordeum vulgare* L.: a genetic study of microspore production and differentiation // Theor. and Appl. Genet.—1987.—74, N 1.—P. 60—64.
24. Jackson J. A., Dale P. J. Callus induction, plant regeneration and an assessment of cytological variation in regenerated plants of *Lolium multiflorum* L. // J. Plant Physiol.—1988.—132, N 3.—P. 351—355.
25. Хохлов С. С., Тырнов В. С., Гришина Е. В. и др. Гаплоидия и селекция.—М.: Наука, 1976.—222 с.
26. Rogozinska J. H., Goska M. Attempts to induce haploids in anther cultures of sugar, fodder and wild species of beet // Acta soc. bot. pol.—1982.—91, N 1.—P. 91—105.
27. Мезенцев А. В., Карелина Н. А. Влияние генотипических особенностей люцерны на каллусообразование и соматический эмбриогенез при различных условиях культивирования тканей // Генетика.—1982.—18, № 6.—С. 999—1003.
28. Омельянюк И. А., Шумный В. К. Изучение особенностей культивирования *in vitro* у различных видов овсов // Изв. СО АН СССР. Сер. биол. наук.—1986.—№ 6.—С. 71—76.
29. Быкова Е. В., Лев С. В. Генотипические особенности процесса каллусогенеза у хлопчатника // Генетика.—1988.—24, № 7.—С. 1317—1370.
30. Bajaj Y. P. S., Gill M. S. *In vitro* induction of genetic variability in cotton (*Gossypium spp. MD*) // Theor. and Appl. Genet.—1985.—70, N 4.—P. 363—368.
31. Зарнадзе Н. Ж., Кутубидзе В. В., Кунах В. А. Получение каллусных тканей от актинидии *chinensis* и *deliciosa* // Субтроп. культуры.—1993.—№ 1—2.—С. 17—24.
32. Румянцева Н. И., Сергеева Н. В., Хакимова Д. Э. и др. Органогенез и соматический эмбриогенез в культуре двух видов гречихи // Физиология растений.—1989.—36, № 1.—С. 187—194.
33. Seitz M. H., Stalker H. N., Green C. C. Genetic variation for regenerative response in immature leaflet cultures of the cultivated peanut *Arachis hypogaea* // Plant Breed.—1987.—98, N 2.—P. 104—110.
34. Abe T., Futsuhara Y. Genotypic variability for callus formation and plant regeneration in rice // Theor. and Appl. Genet.—1986.—72, N 1.—P. 3—10.
35. Biattini M., Baroncelli S., Bennici A. Genetic of growth and differentiation «*in vitro*» of *Brassica oleracea* var. botritis. IV. Genotype-hormone interactions // Z. Pflanzenzucht.—1974.—73.—P. 298—302.
36. Карпель Н. А., Манешина Т. В. Каллусообразование у разных по генотипу растений ячменя // Цитология и генетика.—1977.—11, № 6.—С. 486—490.
37. Yamada Y. Tissue culture studies on cereals // Appl. and Fundam. Aspects Plant Cell, Tissue, and Organ Cult.—Berlin etc., 1977.—P. 144—159.
38. Takiko S. Plant regeneration from the callus induced from wheat embryo // Jap. J. Genet.—1978.—53, N 5.—P. 371—374.
39. Jacobsen H., Ingensiep H. W., Herit M. et al. Tissue culture studies in *Pisum sativum* // Plant Cell Cult. Results and Perspectives.—Amsterdam etc., 1980.—P. 319—324.
40. Смирнов В. А., Смирнова В. В. О генетической детерминированности каллусогенеза у томатов // Цитология и генетика.—1985.—19, № 2.—С. 110—114.
41. Termpieton-Somers K. M., Collins W. W. Heritability of regeneration in tissue cultures of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) // Theor. and Appl. Genet.—1986.—71, N 6.—P. 835—841.
42. Mathias R. J., Fukui K. The effect of specific chromosome and cytoplasm substitutions on the tissue culture response of wheat (*Triticum aestivum*) callus // Ibid.—1986.—71, N 6.—P. 797—800.
43. Kishor P. B. K., Reddy G. M. Callus initiation and plantlet regeneration // Indian J. Plant Physiol.—1987.—30, N 1.—P. 66—70.
44. Лутова Л. А., Забелина Е. К. Каллусо- и побегообразование у различных форм гороха *Pisum sativum* L. в условиях *in vitro* // Генетика.—1988.—24, № 9.—С. 1632—1640.
45. Espinasse A., Lay C. Shoot regeneration of callus derived from globular to torpedo embryos from 59 sunflower genotypes // Crop. Sci.—1989.—29, N 1.—P. 201—205.
46. Izumi I., Fumio K., Hoyoji N. et al. Diallel analysis of callus formation ability in anther culture of rice // Jap. J. Breed.—1991.—41, N 1.—P. 153—162.
47. Abe T., Yuzo F. Diallel analysis of callus growth and plant regeneration in rice seed callus // Jap. J. Genet.—1991.—66, N 2.—P. 129—140.
48. Кунах В. А., Чеченева Т. Н., Моргунов В. В. Получение каллусных тканей от разных по генотипу растений кукурузы // Физиология растений.—1980.—27, № 2.—С. 399—403.
49. Перишина Л. А., Хвостова В. В. Феногенетика мутантов гороха с измененной структурой стебля // Цитогенетика гибридов, мутаций и эволюция кариотипа.—Новосибирск: Наука, 1977.—С. 167—181.
50. Picard E., Buysier J. High production of embryoids in anther culture of pollen derived homozygous spring wheat // Ann. Amelior. Plantes.—1977.—2, N 4.—P. 483—488.
51. Kerdary G. B., Hell K. G., Handro W. Comparative growth of pith tissue from haploid and diploid plants of *Nicotiana tabacum* // Z. Pflanzenphysiol.—1976.—79, N 5.—P. 455.
52. Sopory K. S., Maheshwary S. C. Morphogenetic potentialities of haploid and diploid vegetative parts of *Datura innoxia* // Ibid.—1976.—77, N 3.—P. 272—277.

53. Ogura H. Considerations on the involvements of genetical differences with callus formation in wheat // *Wheat Inform. Serv.*—1977.—N 44.—P. 5—7.
54. Kraus J. E., Handro W., Dietrich S. M. C. Growth peroxidase activity, and protein content in stem pith and callus tissues from haploid and diploid *Nicotiana tabacum* plants // *Physiol. Plant.*—1981.—51, N 2.—P. 157—162.
55. Multani D. S. Tissue culture in diploid and autotetraploid strains of metha (*Trigonella Foenum-graecum L.*) // *Plant Cell Cult. Crop Improv. Proc. Int. Symp. Calcutta (6—10 Dec., 1981).*—New York; London, 1983.—P. 435—439.
56. Славова Й., Ваклинова С., Федина И. Влияние плоидности и состава питательной среды на образование каллусов и интенсивность фотосинтеза сахарной свеклы в культуре *in vitro* // *Физиология растений (София).*—1982.—8, № 4.—С. 3—7.
57. Floh E. I. S., Handro W. Variation of histological patterns in tobacco callus during successive subcultures // *Can. J. Bot.*—1985.—63, N 10.—P. 1794—1800.
58. Зосимович В. П., Лесенко Б. А., Кунах В. А. и др. Культура пыльников *Nicotiana tabacum in vitro*. Сообщ. 1. Цитогенетический анализ растений, образовавшихся из пыльников // *Генетика.*—1974.—10, № 6.—С. 30—36.
59. Козырева О. Г., Лутова Л. А., Фадеева Т. С. Регенерационная способность диплоидных линий земляники вида *Fragaria vesca* и их тетраплоидных аналогов // *IV. Всесоюз. совещ. по полиплоидии: Тез. докл.*—Киев: Наук. думка, 1975.—С. 60.
60. Курсаков Г. А., Себышева Г. А., Дубовицкая Л. А. Особенности каллусообразования у плодовых растений *in vitro* // *Бюл. науч. информ. Центр. генет. лаб.*—1981.—№ 36.—С. 3—6.
61. Falsenburg T., Feldman M., Galun E. Aneuploid and alloplasmic lines as tools for the study of nuclear and cytoplasmic control of culture ability and regeneration of scutellar calli from common wheat // *Theor. and Appl. Genet.*—1987.—74, N 6.—P. 802—810.
62. Higgins P., Mathias R. J. The effect of the 4B chromosomes of hexaploid wheat on the growth and regeneration of callus cultures // *Ibid.*—N 4.—P. 439—444.
63. Lazar M. D., Chen T. H. H., Scoles G. J. et al. Immature embryo and anther culture of chromosome addition lines of rye in chinese spring wheat // *Plant Sci.*—1987.—51, N 1.—P. 77—81.
64. Clare M., Collin J. The production of plantlets from tissue cultures of Brussels sprout (*Brassica oleracea L. var. gemmifera D. C.*) // *Ann. Bot.*—1974.—38, N 158.—P. 1067—1076.
65. Mitchell A. Z., Hanson M. R., Skvirsky R. C. et al. Anther culture of Petunia: genotypes with high frequency of callus, root or plantlet formation // *Z. Pflanzenphysiol.*—1980.—100, N 2.—P. 131—146.
66. Lazar M. D., Schaeffer G. W., Baenziger P. S. Cultivar and cultivar × environment effects on the development of callus and polyhaploid plants from anther cultures of wheat // *Theor. and Appl. Genet.*—1984.—67, N 2—3.—P. 273—277.
67. Novak F. J., Ohnoutkova L., Kubalakov M. Cytogenetic studies of callus tissue of wheat (*Triticum aestivum L.*) // *Cereal. Res. Commun.*—1978.—6, N 2.—P. 135—147.
68. Keys G. J., Collins G. B., Taylor N. L. Genetic variation in tissue cultures of red clover // *Theor. and Appl. Genet.*—1980.—58, N 6.—P. 265—271.
69. Keys G. J., Deaton W. R., Collins G. B. et al. Hybrid vigor in callus tissue cultures and seedlings of *Nicotiana tabacum L.* // *J. Hered.*—1981.—72, N 3.—P. 172—174.
70. Лутова Л. А., Верзина И. И. Наследование способности к каллусо- и корнеобразованию у изолированных семядолей редиса в условиях асептической культуры // *Генетика.*—1984.—20, № 10.—P. 1663—1670.
71. Lazar M. D., Baenziger P. S., Schaeffer G. W. Combining abilities and heritability of callus formation and plantlet regeneration in wheat (*Triticum aestivum L.*) anther cultures // *Theor. and Appl. Genet.*—1984.—68, N 1—2.—P. 131—135.
72. Miah M. A. A., Farle E. D., Khush G. S. Inheritance of callus formation ability in anther cultures of rice, *Oryza sativa L.* // *Ibid.*—1985.—70, N 2.—P. 113—116.
73. Surzsh K. A., Reddy T. P., Reddy G. M. Genetic analysis of certain *in vitro* and *in vivo* parameters in pigeonpea (*Cajanus cajan L.*) // *Ibid.*—P. 151—156.
74. Чеченева Т. Н., Труханов В. А. Генетическая обусловленность каллусообразования и регенерационной способности у кукурузы // *Цитология и генетика.*—1994.—28, № 5.—С. 46—50.
75. Koornneef M., Hanhart C. J., Martinelli L. A genetic analysis of cell culture traits in tomato // *Theor. and Appl. Genet.*—1987.—74, N 5.—P. 633—641.
76. Ohyata K. Department of cell biology // *Annu. Rept. Nat. Inst. Agrobiol. Resour.*—1988.—N 4.—P. 12—17.
77. Mano Y., Rikishi K., Yasuda S. Генетические исследования роста каллуса и регенерация растений из незрелых зародышей ячменя // *Bull. Res. Inst. Bioresour. Okayama Univ.*—1994.—2, N 1.—P. 43—53.
78. Матвеев С. Н., Хотылева Л. В., Каминская Л. Н. Генетический анализ эффективности культуры пыльников тритикале *in vitro* // *Генетика.*—1994.—30, № 9.—С. 1238—1242.
79. Tomes D. T., Smith O. S. The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from elite maize (*Zea mays L.*) germplasm // *Theor. and Appl. Genet.*—1985.—70, N 5.—P. 505—509.
80. Novak F. J., Daskalov S., Brunner H. et al. Somatic embryogenesis in maize and comparison of genetic variability induced by gamma radiation and tissue culture techniques // *Plant Breed.*—1988.—101, N 1.—P. 66—79.
81. Игнатова С. А., Белоусов А. А., Сидоренко Л. В. Генотипическая специфичность морфогенетических процессов в культуре соматических тканей кукурузы // *Цитология и генетика.*—1993.—27, № 3.—P. 39—44.
82. Reddy I. V., Peterson P. A. Effect of age and genetic background on the *in vitro* maize endosperm callus initiation // *Maydica.*—1987.—32, N 2.—P. 151—161.
83. Лутова Л. А., Бондаренко Л. В., Бузовкина И. С. и др. Влияние генотипа растения на регенерационные процессы // *Генетика.*—1994.—30, № 8.—С. 1065—1074.
84. Mathias R. J., Fukui K., Law C. N. Cytoplasmic effects on the tissue culture response of wheat (*Triticum aestivum*) callus // *Theor. and Appl. Genet.*—1986.—72, N 1.—P. 70—75.
85. Орлов П. А. Взаимодействие генома и плазмона в дифференцировке тканей и развитие растений на примере пшеницы // Автореф. дис. ... д-ра биол. наук.—Минск, 1995.—34 с.
86. Кунах В. А. Цитогенетическое изучение клеточных популяций в культуре изолированных тканей растений // Автореф. дис. ... канд. биол. наук.—Киев, 1975.—24 с.
87. Torne J. M., Santos M. A., Pons A. et al. Regeneration of plants from mesocotyl tissue cultures of immature embryos of *Zea mays L.* // *Plant Sci. Lett.*—1980.—17, N 3.—P. 339.
88. Mok M. C., Mok D. W. S., Armstrong D. J. et al. Cytokinin autonomy in tissue cultures of phaseolus: a genotype-specific and heritable trait // *Genetics (USA).*—1980.—94, N 3.—P. 675—685.
89. Mok M. C., Mok D. W. S., Turner J. E. Reversed activities of cytokinin bases and ribonucleosides in callus tissues of

- Phaseolus lunatus* L. // J. Plant Physiol.—1985.—121, N 3.—P. 273—280.
- Jarl C., Bornman C. H. Observations on genotypic variation in *Beta vulgaris* (sugar beet) tissues cultured *in vitro* // Hereditas.—1986.—105, N 1.—P. 55—59.
- Wareing P. F., Al-Chalabi T. Differentiation in plant cells // Biol. plant.—1985.—27, N 4—5.—P. 241—248.
- Rajasekaram K., Hein M. B., Davis G. C. et al. Endogenous growth regulators in leaves and tissue cultures of *Pennisetum purpureum* Schum. // J. Plant. Physiol.—1987.—130, N 1.—P. 13—25.
- Кунах В. А., Аднамова Л. К. Роль фитогормонов в изменчивости числа хромосом в культуре тканей *Haploparpus gracilis* // Докл. АН СССР.—1979.—245, № 4.—С. 967—970.
- Kordan H. A. Mitosis and cell proliferation in lemon fruit explants incubated on attenuated nutrient solutions // New Physiol.—1977.—79, N 3.—P. 673—677.
- Masuda F., Kodu Y., Okazawa Y. Callus formation and embryogenesis of endosperm tissues of parsley seed cultured on hormone-free medium // Physiol. plant.—1977.—41, N 2.—P. 135—139.
- Szweykowska A. Regulation of organogenesis in cell and tissue cultures by phytohormones // Regulation of developmental process in plants: Proc. conf.—Halle, 1977.—P. 219—235.
- Doley W. P., Saunders J. W. Hormone-free medium will support callus production and subsequent shoot regeneration from whole plant leaf explants in some sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) populations // Plant Cell Repts.—1989.—8, N 4.—P. 222—225.
- Кунах В. А., Войтюк Л. И., Алхимова Е. Г. и др. Получение каллусных тканей и индукция органогенеза у *Pisum sativum* L. // Физиология растений.—1984.—31, № 3.—С. 542—548.
- Mathias R.-J., Brown C., Brooks F. J. et al. Plant transformation. Cereal transformation and tissue culture studies // ARFC. Inst. Plant. Sci., John Innes Inst.—Norwich, 1988.—P. 16—17.
- Копертех Л. Г., Бутенко Р. Г. Нативные фитогормоны экспланта и морфогенез пшеницы *in vitro* // Физиология растений.—1995.—42, № 4.—С. 555—558.
- Ollina G. F., Martini G., Nuti R. V. et al. Interazione genotipo-ambiente in espianti di *Nicotiana spp.* coltivati *in vitro* // G. bot. ital.—1979.—113, N 3.—P. 198.
102. Hanzel J. J., Miller J. P., Brinkman M. A. et al. Genotype and media effects on callus formation and regeneration in barley // Crop Sci.—1985.—25, N 1.—P. 27—31.
103. Ishar S., Zelcer A. Cell, tissue and organ culture in *Petunia*.—Berlin etc., 1984.—P. 111—123.
104. Хотылева Л. В., Ермишин А. И. Каллусообразование в культуре *in vitro* у дителоцентрических линий мягкой пшеницы сорта Чайниза Спринг в зависимости от состава питательной среды // Докл. АН БССР.—1980.—24, № 2.—С. 186—187.
105. Chriqui D. Donnees nouvelles sur les mecanismes de la dediferenciation chez les vegetaux // Arch. anat. microsc. et morphol. exp.—1983.—72, N 3.—P. 248—249.
106. Joarder O. I., Joarder N. H., Dale P. J. *In vitro* response of leaf tissues from *Lolium multiflorum* — a comparison of leaf segment position, leaf age and *in vitro* mitotic activity // Theor. and Appl. Genet.—1986.—73, N 2.—P. 286—291.
107. Левенко В. А., Юркова Г. Н., Кунах В. В. и др. Мало-хромосомный злак *Zingera* — новый модельный объект для культуры клеток и тканей растений // Докл. АН СССР.—1976.—228, N 1.—С. 209—210.
108. Cai Qihua, Gao Mingwei, Liang Zhuqing. *In vitro* culture mutagenesis for hybrid rice improvement // Acta agr. nucl. sin.—1990.—4, N 3.—P. 169—174.
109. Гирко И. С., Василенко В. И., Шубенко Н. П. Размножение *in vitro* межродовых гибридов тритикале и ячменя // Селекция и семеноводство.—1993.—№ 1.—С. 17—19.
110. Kao K. N., Michalyuk M. R. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfalfa // Z. Pflanzenphysiol.—1980.—96, N 2.—P. 135—141.
111. Бродский В. Я., Урываева И. В. Клеточная полиплоидия. Пролиферация и дифференцировка.—М.: Наука, 1981.—259 с.
112. Васильева В. Е., Батыгина Т. Б. Культивирование *in vitro* зародышей и семян лотоса, изолированных на разных стадиях развития // Физиология растений.—1981.—28, № 2.—С. 319—327.

УДК 575.2:581.143.6

Поступила в редакцию 05.03.97