

82407



С.-А. РАХМАНКУЛОВ
А. АЗИЗХОДЖАЕВ
Д. М. ДАМИНОВА
М. С. РАХМАНКУЛОВ



НЕТРАДИЦИОННЫЕ МЕТОДЫ В СЕЛЕКЦИИ ХЛОПЧАТНИКА

633.54
Н-57

«Фан»

82407

633.511.631.02(004.13)

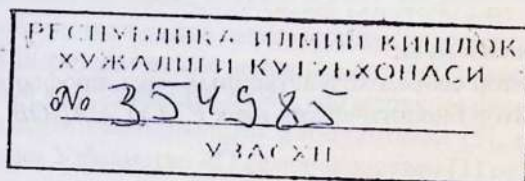
H-54

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО И ВОДНОГО ХОЗЯЙСТВА
РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН

УЗБЕКСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
СЕЛЕКЦИИ И СЕМЕНОВОДСТВА ХЛОПЧАТНИКА

С.-А.РАХМАНКУЛОВ, А.АЗИЗХОДЖАЕВ,
Д.М.ДАМИНОВА, М.С.РАХМАНКУЛОВ

НЕТРАДИЦИОННЫЕ МЕТОДЫ В СЕЛЕКЦИИ ХЛОПЧАТНИКА



Ташкент
Издательство «Фан» Академии наук
Республики Узбекистан
2009

Монография посвящена разработке биотехнологических методов и получению на их основе отдаленных межвидовых гибридов хлопчатника. Изучены действия различных компонентов искусственного питания на рост и развитие *in vitro* незрелых гибридных зародышей. Для последних определена оптимальная питательная среда. Разработаны способ пересадки пробирочных растений в грунт, способ преодоления нескрещиваемости с помощью экзогенных фитогормонов, схема получения амфидиплоидов хлопчатника и их беккросс-потомства. Получены гибридные растения между отдаленными разнохромосомными видами (тетраплоидом *G. hirsutum* L. ($2n=4x=52$) и диплоидами с $2n=26$ - *G. raimondii* Ulbr., *G. thurberi* Tod., *G. anomalum* Waw., *G. sturtii* F.Müell., *G. davidsonii* Kell., *G. harknessii* Brand.) и их беккросс-поколения (с участием *G. sturtii* F.Müell., *G. raimondii* Ulbr., *G. harknessii* Brand., *G. aridum* Skov., *G. triphyllum* Horch.). Установлена возможность отбора клеток методом клеточной селекции и создания клеточных линий хлопчатника, устойчивых к высокому хлоридному засолению. Выявлены солевыносливые формы и на их основе созданы линии Л-6, Л-8, Л-198 и сорт «Умид».

Для физиологов, научных работников в области генетики и селекции хлопчатника, а также преподавателей, магистров и студентов биологических факультетов вузов.

Ответственный редактор:
академик АН РУз Д.А.МУСАЕВ

Рецензенты:
доктор сельскохозяйственных наук, профессор Х.САЙДАЛИЕВ
доктор биологических наук Р.М.УСМАНОВ

ISBN 978-9943-09-873-2 © Издательство «Фан» АН РУз,
2009 г.

ПРЕДИСЛОВИЕ

Хлопчатник – важнейшая культура, возделываемая во многих странах мира, главным образом, ради волокна, которое занимает и еще длительное время будет занимать лидирующее положение среди различных видов текстильного сырья. По количеству и ценности получаемых продуктов хлопчатник занимает первое место среди сельскохозяйственных технических культур. Хлопчатник дает сырье для многих отраслей народного хозяйства, например таких, как текстильная, пищевая, химическая, бумажная, оборонная и строительная промышленности, животноводство и др.

Из хлопчатника получают более 1200 полезных веществ, необходимых для развития химической, фармакологической и других отраслей промышленности [52].

Узбекистан по производству хлопка-сырца занимает 6-е место в мире, а по экспорту хлопкового волокна – 2-е [131].

В настоящих экономических условиях новые селекционные сорта должны отличаться высокой конкурентоспособностью, рентабельностью, по основным показателям качества продукции отвечать требованиям не только потребителей республики, но и мирового рынка. В этой связи, учитывая важное значение возделывания хлопчатника в республике, правительство страны приняло ряд законов, направленных на дальнейшее повышение производства хлопка-сырца и улучшение качества продукции. Примером тому могут служить постановления Кабинета Министров РУз - № 491 от 25 ноября 1998 г. «О программе сортообновления и сорторазмещения хлопчатника на 1999-2000 годы» [3], № 477 от 19 декабря 2001 г. «О производстве хлопка-сырца, сортоном размещении хлопчатника и мерах по совершенствованию сортообновления в 2002 году» [4], № 604 от 23 декабря 2004 г. «О мерах по совершенствованию организации семеноводства хлопчатника» [5], а также законы Республики Узбекистан «О семеноводстве» [1] от 29 августа 1996 г. и «О селекционных достижениях» [2] от 30 августа 1996 г.

В этой связи вопрос о повышении выхода волокна и семян, улучшении их качества стал приобретать первостепенную значимость. Создание новых сортов и гибридов с новой генетической основой не только предусматривает повышение урожайности, но и выдвигает актуальную проблему улучшения технологических

свойств волокна и химического состава ядра семени, а также устойчивости растений к болезням и вредителям, засолению, засухе и высокой температуре. Решение данных задач полностью зависит от успешного использования в селекции сочетания традиционных и нетрадиционных методов исследований. В этом плане для практической селекции большой научный интерес представляет использование генетического потенциала диких видов хлопчатника в гибридизации с культивируемыми сортами. Как известно, многие диплоидные виды рода *Gossypium* L. обладают такими уникальными хозяйственно-ценными признаками, как устойчивость к заболеваниям, насекомым-вредителям, засухе, засолению, повышенная крепость волокна и т.д.

Проблема исходного материала на современном этапе приобретает все большую значимость в связи с тем, что в ходе интенсивной селекции в значительной мере использован генетический потенциал культивируемых видов. Это вызывает необходимость изыскивать новые генетические формы с полезными для селекции признаками. Одним из наиболее эффективных источников нового формо- и видообразования считается отдаленная межвидовая гибридизация, с помощью которой получены гибридные растения между диплоидными и тетраплоидными видами хлопчатника [21, 42, 48, 99, 196, 294]. Однако эти гибриды, в основном, получены не системно из-за разнохромосомности и отдаленности видов, т.е. из-за межвидовой несовместимости.

Работы по биотехнологии хлопчатника в Узбекском научно-исследовательском институте селекции и семеноводства хлопчатника были начаты в 1981 г. в лаборатории «Биохимия и физиология хлопчатника» под руководством проф. С. -А. Рахманкулова. Сотрудниками этой лаборатории разработаны физиолого-биотехнологические методы преодоления нескрещиваемости, с помощью которых получены гибриды и их беккросс-потомства между сортами вида *G. hirsutum* L. и дикими диплоидами *G. sturtii* F. Müell., *G. aridum* Skov., *G. triphyllum* Horch., *G. harknesii* Brandg., *G. raimondii* Ulbr. и др. Эти гибриды доведены до состояния линий, отдельные из которых изучаются в станционном сортоиспытании при институте.

Авторы не ставят цель охватить все стороны биотехнологии в целом, так как круг вопросов, который включается в проблему биотехнологии, очень широк, и осветить его в одной монографии

невозможно. Вместе с тем, авторы рассматривают данный труд как свою первую работу и надеются, что эта книга будет способствовать дальнейшему прогрессу в исследованиях по биотехнологии растений, в частности хлопчатника.

В работе приведено краткое описание состояния биотехнологии, излагаются современные методы культуры *in vitro* органов и тканей хлопчатника, детально характеризуется состав питательных сред для каллусообразования и соматического эмбриогенеза. Значительное внимание уделено влиянию фитогормонов на преодоление нескрещиваемости у хлопчатника и описанию полученных амфидиплоидов, освещен вопрос о клеточной селекции на солеустойчивость, даны результаты изучения ряда новых линий, полученных традиционными и нетрадиционными методами селекции.

Авторы выражают искреннюю признательность академику ВАСХНИЛ [С.М.Мирахмедову] (УзНИИССХ) за поддержку и внимание к работе, члену-корреспонденту РАН Р.Г.Бутенко (НИИ физиологии растений им. К.А.Тимирязева, Москва) за помощь в освоении методов культуры тканей и зародышей *in vitro* и ценные советы, академику АН РУз Н.А.Власовой (ИГиЭБР), к.б.н. [Е.М.Эрккеновой] (НПЦ «Ботаника»), к.б.н. С.А.Джатаеву (ИГиЭБР) за оказание методической помощи в проведении экспериментов, а также д.б.н., проф. А.Э.Эгамбердиеву (УзНИИССХ) за любезно предоставленные амфидиплоиды хлопчатника с участием *G. aridum* Skov. и *G. triphyllum* Horch.

В решении некоторых вопросов, освещенных в книге, в разные годы принимали непосредственное участие научные сотрудники З.М.Умаров, Т.Ш.Кандимов и Б.С.Джураев, за что авторы выражают им огромную благодарность.

Авторы глубоко признательны д.б.н. М.Б.Ахмедову, к.б.н. О.Я.Весмановой, к.с.-х.н. А.Б.Амантурдиеву, к.с.-х.н. Ш.Э.Намазову, к.б.н. Т.П.Коровиной за ценные замечания и указания, сделанные при просмотре рукописи.

Авторы будут очень признательны за все указания и возможные замечания.

Принятые сокращения

НУК – α -нафтилуксусная кислота
ИУК – β -индолилуксусная кислота
2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота
БАП – 6-бензиламинопурин
Na-ЭДТА – Na-этилендиаминтетрауксусная кислота
ГК – гибберелловая кислота
АБК – абсцизовая кислота
MS – Мурасиге-Скуга
LS – Линсмайер-Скуга
BT – Бисли-Тинга
МБИ – микроскоп биологический исследовательский
МБР – микроскоп биологический рабочий
ФН – фотонасадка
МФН – микрофотонасадка
ГМ – генмодифицированные
ГМО – генмодифицированные организмы
УзНИИССХ – Узбекский научно-исследовательский институт селекции и семеноводства хлопчатника
УзНИИ – Узбекский научно-исследовательский институт
ИГиЭБР – Институт генетики и экспериментальной биологии растений
НПЦ – Научно-производственный центр
ЦОМС – Центральная опытная мелиоративная станция

ГЛАВА 1 КОРОТКО О БИОТЕХНОЛОГИИ

В выполнении продовольственной программы страны большая роль отводится сельскохозяйственной науке, в том числе селекции растений. В этой связи одна из самых серьезных проблем современности – необходимость быстрого увеличения производства всех видов сельскохозяйственной продукции.

Наряду со всесторонним улучшением малопродуктивных земель, повышением общей культуры земледелия необходимо использовать и такое могучее средство, как совершенствование самих растений. Решение последнего представляется невозможным без внедрения в практику нетрадиционных методов селекции и технологий повышения продуктивности растений. Исследования такого рода приобретают важнейшее фундаментальное и практическое значение.

Совершенствование, повышение продуктивности растений и придание им хозяйственно-ценных признаков на современном этапе развития науки и производства связаны с развитием принципиально новых подходов в биологии и биотехнологии растений.

В наше время селекционер-генетик, как генеральный конструктор, опираясь на данные биологической науки, агрономии и службы защиты растений, направляет деятельность коллектива ученых на создание сорта. Яркий пример плодотворной роли теории – выведение новых высокопродуктивных полиплоидных сортов и гибридов сельскохозяйственных культур.

Полиплоидия – особая категория наследственных изменений, связанная с кратным увеличением количества хромосом в клеточном ядре. Пшеница, хлопчатник, картофель, просо, сахарный тростник, люцерна и ряд других сельскохозяйственных растений – полиплоиды, возникшие естественным путем. Видимо, именно этим обусловлены их положительные свойства и признаки, ради которых они были отобраны и внедрены в культуру человеком.

Экспериментальное удвоение числа хромосом в клетках впервые было осуществлено И.И.Герасимовым. Ему в 40-х годах прошлого столетия удалось найти эффективное полиплоидизирующее вещество – алкалоид колхицин. Воздействуя им на растущую цветочную почку, можно целенаправленно изменять внутриклеточ-

ные преобразования и вместо обычного – двойного (диплоидного) набора хромосом получать учетверенный (тетраплоидный). Такая генетическая перестройка влечет за собой изменение основных особенностей растения. Это позволило взять новый метод на вооружение селекции.

В 50-х годах прошлого столетия возникла еще одна новая наука – молекулярная биология, а еще через 20 лет на ее основе – генетическая инженерия. Всего 10 лет понадобилось ей, чтобы дать биотехнологии новое оружие – принципиальную возможность целенаправленно создавать организмы, которые производят продукты и осуществляют процессы, востребованные человеком, т.е. возникла новая наука (биотехнология), которая дала человечеству невиданный прогресс.

С древних времен известны отдельные биотехнологические процессы, используемые в различных сферах практической деятельности человека. К ним относятся хлебопечение, виноделие, приготовление кисломолочных продуктов и т. д. Однако биологическая сущность этих процессов была выяснена лишь в XIX в. благодаря работам Л.Пастера. В первой половине XX в. сфера приложения биотехнологии пополнилась микробиологическим производством ацетона и бутанола, антибиотиков, органических кислот, витаминов, кормового белка. Немаловажный вклад в биотехнологические разработки внесли российские исследователи. В 1930-е годы были построены первые заводы по получению кормовых дрожжей на гидролизатах древесины, сельскохозяйственных отходах и сульфитных щелоках. Под руководством В.Н.Шапошникова успешно внедрена технология микробиологического производства ацетона и бутанола. Большую роль в создание основ биотехнологии внесло учение В.Н.Шапошникова о двухфазном характере брожения. В 1926 г. были исследованы биоэнергетические закономерности окисления углеводов микроорганизмами. В последующие годы биотехнологические разработки широко использовались для расширения «ассортимента» антибиотиков для медицины и животноводства, ферментов, витаминов, ростовых веществ, пестицидов. С момента создания в 1963 г. Всесоюзного научно-исследовательского института биосинтеза белковых веществ наланилось крупнотоннажное производство богатой белками биомассы микроорганизмов как корма. В 1966 г. микробиологическая промышленность была выделена

в отдельную отрасль. Имеются ценные разработки по получению новых источников энергии биотехнологическим путем (технологическая биоэнергетика). Следует отметить большое значение биогаза – заменителя топлива, получаемого из недр земли.

Значительные успехи, достигнутые во второй половине XX в. в фундаментальных исследованиях в области биохимии, биоорганической химии и молекулярной биологии, создали предпосылки для управления элементарными механизмами жизнедеятельности клетки, что явилось мощным импульсом для развития биотехнологии. Выяснение роли нуклеиновых кислот в передаче наследственной информации, расшифровка генетического кода, раскрытие механизма индукции и репрессии генов, совершенствование технологии культивирования микроорганизмов, клеток и тканей растений и животных позволили разработать методы генетической и клеточной инженерии, с помощью которых можно искусственно создавать новые формы высокопродуктивных организмов. Генетическая и клеточная инженерия рассматривается как принципиально новое направление биологической науки, которое сегодня ставят в один ряд с расщеплением атома, преодолением земного притяжения и созданием средств электроники [8, 9].

Успехи, достигнутые в этой области науки, привели к созданию методов, дающих возможность манипулировать геномами и преодолевать межвидовые барьеры. Эти методы, разработанные, в основном, для культуры микроорганизмов, в принципе оказались приемлемыми и к растениям. Удалось создать экспериментальные системы, позволяющие получать и поддерживать культуру клеток высших растений подобно культурам микроорганизмов. Стало возможным применять к растениям высокоэффективные методы и технологии. Так началось развитие клеточной и генетической инженерии, определивших качественно новый уровень биотехнологии, которая сегодня стремительно вышла на передний край научно-технического развития.

К настоящему времени созданы трансгенные сорта нескольких десятков видов растений, включая сою, кукурузу, хлопчатник, рапс, сахарную свеклу, картофель, томат, табак, пшеницу, рис, люцерну, яблоню, виноград, эвкалипт и др.

Однако отношение к ГМ-продуктам среди ученых всего мира неоднозначно. Так, например, одни считают, что внедрение чуже-

родных генов в геномы растений может повысить токсичность и аллергенность растительной пищи, другие отмечают, что, несмотря на обширные поиски в течение четверти века, не выявлено достоверных свидетельств наличия таких свойств у трансгенных сортов растений. Напротив, аллергенность трансгенного риса ниже, чем обычного.

Гипотетически трансгенные растения опасны тем, что устойчивые к антибиотикам гены-маркеры могут включиться в геномы кишечных бактерий, способных вызывать болезни человека и домашних животных. Однако такие гены нужны лишь при трансформации генов растений, после чего их устраняют.

Тревогу вызывает возможность «перебежки» в результате перекрестного опыления пересаженных генов, например, выносливости к гербицидам, устойчивости к вредителям и болезням, из трансгенных сортов растений в растущие по соседству дикие сородичи. Это может создавать «сверхсорняки», что весьма вероятно для перекрестных растений.

Несмотря на это, США производят около 60 % трансгенных растений в мире, 70 % продуктов которых потребляется внутренним рынком, а 30 % импортируется.

Хотя создание сортов трансгенных растений требует огромных затрат, их широко внедряет Китай, не только обеспечивающий себя продуктами питания, но и значительную часть их экспортирующий, Индия на 2% возделываемых земель кормит 16% населения. Когда не хватает ресурсов и неограниченно растет население и его потребительские спросы, генетическая инженерия не имеет альтернатив [188].

Подавляющее большинство биотехнологий для растений основано на использовании культур тканей, клеток и протопластов. Ценность данной экспериментальной системы определяется её большими потенциальными возможностями в решении практических и фундаментальных проблем биологии и создании новых эффективных и безопасных биотехнологий.

К настоящему времени разработаны специальные питательные среды и асептические условия, в которых изолированная растительная клетка развивается как обычный одноклеточный организм. Культивируемые клетки могут сохранять тотипотентность, т.е. способность к выполнению программы развития, в результате

которого из культивируемой соматической клетки возникает целое растение [59, 76, 150, 151, 158]. Результаты вышеуказанных работ указывают на возможность перехода в эксперименте от клеточного уровня на организменный, и наоборот, что имеет важнейшее значение в исследовательской работе.

Применение биотехнологических методов в селекции растений предпринимается, в основном, в двух направлениях: манипулирование на уровне клеток (протопластов) и манипулирование на уровне молекулы ДНК. Развитие этих направлений несет в себе возможность разработки экспериментальной системы, позволяющей переделать генетический аппарат по заранее намеченному плану. Генетическое конструирование растений, являющееся конечной целью таких исследований, представляет собой синтетическую научно-философскую методологию изучения растений [75, 76]. Этот подход, возможно, позволит столь детально охарактеризовать основные ключевые процессы, что откроет путь к их прямой модификации в нужную сторону. Поэтому «конструирование растительной клетки» — это не только способ получения новых форм растений, но и синтетический метод исследования новых биологических систем и процессов.

Благодаря быстрому прогрессу в области биотехнологии микро-организмов подходы генной и клеточной инженерии уже находят должное применение для высших растений. Чтобы применить к высшим растениям технологию генетического манипулирования *in vitro*, необходимо модифицировать (реконструировать) отдельную клетку и регенерировать из нее целое растение. Возможности генетического манипулирования растительными клетками значительно расширились с появлением методов получения изолированных протопластов, что сделало реальным осуществить микрохирургию клеток, ампутиацию отдельных ее частей, пересадку чужих оргanelл и введение новой генетической информации в ДНК изучаемого объекта [76, 167 и др.]. Сочетание этих возможностей со способностью голых протопластов вновь покрываться целлюлозной оболочкой и далее служить для регенерации растения является радикальным средством реконструкции растений. Проведенные исследования в этом направлении, особенно в области суспензионной и протопластной культур, в ряде случаев оказались успешными [141, 279, 290, 334]. Возможность реконструкции хозяйственно

важных растений определяется тем, насколько успешно будет решена проблема «растение-протопласты-каллус-растение».

В настоящее время разработаны различные биотехнологии, которые уже нашли выход в практическую селекцию или будут применены в ближайшем будущем. Генетическая изменчивость, обусловленная условиями культуры *in vitro*, легла в основу получения соматоклональных вариантов растений [89, 269, 296, 297]. Чрезвычайно перспективны для селекционного процесса такие подходы, как гибридизации соматических клеток путем слияния протопластов [63, 75, 76, 167, 182], перенос генов в клетки растений [97, 144, 269, 299], мутагенез и селекция на клеточном уровне [167, 311].

Однако при определенных достижениях биотехнологии все же ее возможности в селекции растений, особенно сельскохозяйственных культур, до сих пор остаются не полностью реализованными. Основные причины этого – слабая разработанность методик культивирования протопластов, клеток и регенерации из них растений, отсутствие эффективных способов введения в клетки сельскохозяйственных культур чужеродной ДНК, нерешенность методических и методологических проблем клеточной и тканевой селекции на устойчивость к неблагоприятным, экстремальным факторам, ограниченность знаний об особенностях жизнедеятельности клеток сельскохозяйственных растений в культуре и механизмах регуляции дифференцировки.

Как вытекает из литературных данных, прогресс в биотехнологии в большинстве случаев достигнут для злаковых растений, в частности: риса [250, 264], сахарного тростника [319], ржи [295], ячменя [73, 152], пшеницы [150].

Хлопчатник – важнейшая волокнистая (техническая) культура, являющаяся наиболее трудным объектом клеточной и генетической инженерии. По сравнению с другими культурами клетки и ткани хлопчатника трудно поддаются процессу регенерации. Тем не менее, исследование культуры тканей и клеток открывает возможности не только для генетической инженерии, но и для базисного изучения физиологии, генетики и других областей знания о растении.

H.J.Price и R.H.Smith [300] впервые индуцировали соматический эмбриогенез хлопчатника вида *G.klotzschianum* Anderss. G.N.Davidonis и R.Hamilton [230] описали соматический эмбриогенез и регенерацию растений из каллусных культур хлопчатника

сорта *Coker-310*. Эксплантатами при этом служили семядольные листья проростков хлопчатника.

Другие исследователи [314, 331, 343, 344] при культивировании клеток хлопчатника *in vitro* использовали различные подходы. В частности, регенерированные растения были получены из различных видов хлопчатника [342] и различных эксплантов, таких как гипокотиль, котиyledон, корень [344], пыльники [343].

N.L.Trolinder и J.R.Goodin [331] получили регенерацию растений хлопчатника из суспензионных культур, из которых восемь вариантов оказались способными к эмбриогенезу. При этом, как отмечают авторы, сорт *Coker-312* отличился высоким эмбриогенным потенциалом.

Об индукции с высокой частотой соматических эмбриоидов в суспензионной культуре сорта *Coker-310* также отмечает J.Finer [238], которому удалось регенерировать фертильные растения. Исследования суспензионных культур позволили обнаружить цитологические нарушения в регенерированных растениях [268].

A.A.Абдукаримов и др. [7] сообщают об индукции соматического эмбриогенеза из эксплантов листа взрослого растения вида *G.klotzschianum* Anderss. Культивирование соматических эмбриоидов различной стадии стимулировало развитие регенерантных растений.

В работах С.В.Льва [118] получен эмбриогенез с регенерацией целого растения на сорте АН-410 вида *G.hirsutum* L.

Соматический эмбриогенез был получен у сортов *Coker-312* и *T-25* на жидких и полутвердых средах [242]. Из анализированной литературы видно, что генотип сорта *Coker* является более эмбриогенным по сравнению с другими генотипами.

Как кажется на первый взгляд, человек уже начал управлять жизнью хлопчатника в пробирках, однако, разработанная схема экспериментов для сортов типа *Coker*, к сожалению, не столь эффективна для представителей других генотипов рода *Gossypium* L. Преодоление специфичности генотипов к соматическому эмбриогенезу очень важно, так как только в случае успешного эмбриогенеза возможно получение целых растений с высокой частотой в роде *Gossypium* L., которые в дальнейшем можно трансформировать [238].

Здесь на основании вышеизложенного необходимо отметить,

что в роде *Gossypium L.* пока индуцирован соматический эмбриогенез лишь у серии сортов американской селекции *Coker* вида *G.hirsutum L.* и у вида *G.klotzschianum Anderss.* Что касается технологии протопластов, которые дают дополнительные возможности модификации генома путем электропорации и слияния протопластов, то здесь исследования в роде *Gossypium L.* продвинулись меньше, нежели в культуре ткани. Получение каллуса из изолированных протопластов *G.hirsutum L.* является пока наибольшим успехом в этой области.

В культуре клеток хлопчатника ряд исследователей [6, 248, 306] использовали другой подход. В частности, использованная ими система не зависела от генотипа растения, т.е. авторы предлагали использовать меристемные клетки изолированных побегов. Нетрадиционный подход в трансформации использовали T.Gould и др. [249]. Авторы разработали протокол для быстрой генотипнезависимой трансформации и регенерации видов *Gossypium L.* Изолированные апикальные почки инокулировали супервирулентным штаммом агробактерии. Корнеобразование наблюдали через 6-10 недель от начала культивирования. Далее, как отмечают авторы, дедифференциация и мутации побегов были очень низкими.

Н.В.Пролетова и др. [147], используя методы культуры пыльников и клеточного отбора на устойчивость к фузариозному увяданию клеток льна-долгунца, получили как устойчивые, так и восприимчивые генотипы.

Некоторые исследователи [64, 118, 318], исследуя каллусную ткань некоторых видов хлопчатника, обнаружили, что гипокотильная часть растения дает наиболее быструю пролиферацию каллуса по сравнению с семядольными или листовыми тканями.

Для получения каллусных клеток у хлопчатника одни исследователи [105, 116, 300, 332, 333] использовали, в основном, гипокотиль 5-8-дневных проростков, другие авторы [231] – семядольные листья.

Отдельные научные исследования на хлопчатнике ведутся на «сuspензионных культурах». Так, N.Trolinder et al. [331] сообщили о развитии в сuspензионной среде в волокнообразных структурах единичных клеток.

Как вытекает из вышеприведенных примеров, лишь ограниченное количество генотипов поддается соматическому эмбриогенезу и регенерации, которые, в основном, происходят в пределах сортов

линии *Coker*. Поэтому основным вопросом культуры клеток и органов хлопчатника является создание такой системы регенерации, которая будет приемлема к широкому ряду генотипов.

Использование диких сородичей в селекции культурных видов в большинстве случаев затруднено и малоэффективно из-за явления межвидовой несовместимости, проявляющейся в процессе опыления и оплодотворения. Для преодоления барьера нескрещиваемости успешно применяются методы культуры *in vitro* оплодотворенных семян и незрелых зародышей. Однако этот метод применим в тех вариантах гибридизации, где осуществляется оплодотворение и зародыш проходит первые стадии развития. По данным многочисленных исследователей [49, 50, 53, 56], при отдаленной межвидовой гибридизации растений, в частности хлопчатника, чаще всего нарушения наблюдаются в период оплодотворения, что приводит к остановке деления клеток зиготы и развития эндосперма. По всей вероятности, это связано с нарушением функционирования хромосом двух генотипов в одной клетке. Другие исследователи [42, 44, 49, 50, 51] считают, что межвидовая несовместимость выражается в нарушении физиологических процессов. Для преодоления этого барьера необходимы факторы, регулирующие физиолого-биохимические процессы и функции генома в клетке, каковыми являются фитогормоны.

В.П.Банникова [49] отмечает, что изучение физиологических нарушений при отдаленной гибридизации, особенно в процессе оплодотворения, предоставляет возможность для преодоления барьера несовместимости в эмбриогенезе. По утверждению ряда исследователей [65, 110, 165] рецепторами генома и ответственными за рост и развитие клеток являются фитогормоны. Некоторые исследователи пытались использовать это свойство фитогормонов для преодоления несовместимости при отдаленной межвидовой гибридизации растений.

Как видно из анализа литературных данных, эффективность исследований в области генетической трансформации растений и селекции *in vitro* во многом зависит от способности используемого объекта к индукции морфогенетических процессов на этапе культивирования. При этом показано, что поиск доноров высоко-го эмбриогенного и регенерационного потенциала представляется важным в культуре клеток, тканей и пыльников.

Проведенные исследования [120] по культивированию *in vitro* двух типов эксплантов мягкой пшеницы: изолированных пыльников и незрелых зародышей у дигампоидных линий и их гибридов первого поколения, показали различную реакцию изучаемых генотипов по способности к индукции морфогенетических процессов в зависимости от типа экспланта. В результате выделен генотип *Dh 60-10 x Jh M8*, обладающий повышенной регенерационной способностью в культуре *in vitro* исследуемых гаметофитных и спорофитных тканей. Показано также, что использование в гибридизации дигампоидных линий с хорошей реакцией на условия культивирования различных типов эксплантов позволяет создавать гибриды с высоким регенерационным потенциалом.

Известно, что на андрогенетическую активность влияют факторы, сдвигающие половой баланс в цветках в сторону феминизации. К подобному сдвигу полового баланса приводит преобладание цитокининов или ауксинов над гиббереллинами [252].

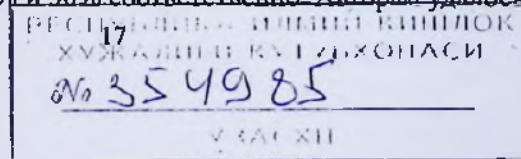
По мнению М.Х.Чайлахяна [187], регуляция проявления пола у растений с помощью фитогормонов может быть эффективна только на ранней фазе развития растений. Поэтому исследователи [107] изучали эффект обработки фитогормонами на ранней стадии развития (стадия проростка) растений тритикале - доноров пыльников. Семена тритикале ДЛ475 проращивали и яровизировали в растворах фитогормонов: 2,4-Д - 6 мг/л; зеатин - 2 мг/л; 6-БАП - 10 мг/л и АБК - 2 мг/л. Контрольные семена замачивали в дистиллированной воде. В опыте высокий выход новообразований наблюдался при обработке семян раствором 2,4-Д. «Количество эмбрионидов на 100 высаженных пыльников» при данной обработке составил 0,67, показатель «количество каллусов на 100 высаженных пыльников» оказался наибольшим - 2,01. При обработке зеатином показатели Е/100А и С/100А составили 0 и 0,56, при обработке 6-БАП - 0 и 0,42 соответственно. Под влиянием абсцизовой кислоты лишь незначительно повышался выход каллусов - С/100А = 0,17. В контроле оба показателя (Е/100А и С/100А) были равны нулю. Полученные автором результаты показывают, что обработка растений - доноров пыльников регуляторами роста на ранней стадии развития (прорастание семян) позволяет увеличить выход новообразований в культуре пыльников.

Т.С.Раковцева и др. [149] изучали влияние отдельных хромосом

ржи на особенности образования каллусных культур и проявление в них регенерационной способности при культивировании незрелых зародышей пшенично-ржаных замененных линий *Triticum aestivum* L. сорта Саратовская-29, *Secale cereale* L. сорта Онохойская. Выявлены различия между отдельными линиями по частоте образования эмбриогенного каллуса, способного к регенерации проростков, и частоте образования каллуса, формирующего корнеобразные культуры. Установлено, что хромосомы 2R и 3R ржи сорта Онохойская при функционировании в генетической среде мягкой пшеницы Саратовская-29 оказывают стимулирующее действие на образование эмбриогенного каллуса - с высоким потенциалом к регенерации проростков. Хромосомы 2R ржи вместо хромосомы 2D в геноме мягкой пшеницы приводят к подавлению развития каллуса, хромосомы 1R и 6R ржи супрессируют развитие эмбриогенного каллуса, способного к регенерации проростков. Авторами работы на основании этих данных сделано заключение о хромосомной локализации генов, стимулирующих и супрессирующих образование эмбриогенного каллуса у ржи.

Подобные исследования проводились О.В.Ткаченко [178], результаты которых показывают, что на этапе каллусогенеза яровая твердая пшеница практически не отличалась от мягкой. Однако степень дифференцированности образующихся структур у твердой пшеницы значительно ниже, чем у яровой мягкой пшеницы. Установлено, что *Rht*-гены оказывают различное влияние на морфогенез соматических тканей и гаплоидных клеток *in vitro*. Ген *Rht-Bic*, как отмечают исследователи, положительно повлиял на выход морфогенных каллусов и пыльников, а также на регенерацию растений.

А.А.Алипенко и др. в своих исследованиях использовали ткани щитка зрелых зародышей и апикальные меристемы проростков риса у пяти сортов. Экспланты вычленили из асептически выращенных 2-3-дневных проростков. Для индукции каллусообразования экспланты высаживали на твердые питательные среды, содержащие соли MS, витамины B5, 2% сахарозы, 0,8% агара, pH 5,8, с добавлением 2, 4, 6, 8 или 10 мг/л 2,4-Д. Из изученных сортов наиболее перспективными оказались апексы проростков сорта Истиклол и щитки зрелых зародышей сорта Аланга. Частота каллусообразования составила 75% и 50% соответственно. Авторам удалось



из местных сортов риса выявить наиболее подходящие генотипы, типы эксплантов и гормональный состав питательных сред. Подобраны условия для получения растений-регенерантов.

Наряду с вышеуказанными методами селекции следует отметить, что в последние годы начинает развиваться новый нетрадиционный метод в селекции хлопчатника, основанный на хромосомно-кариологических данных [45, 46].

Таким образом, успехи сельскохозяйственной биотехнологии на сегодняшний день не столь велики, и на ее основе производится не так много продуктов, но перспективы ее развития беспредельны. Так, не случайно биотехнологии в настоящее время уделяют много внимания и выделяют огромные средства во всех развитых странах мира. В Германии, Франции, странах СНГ, Канаде, Корее, Великобритании, Бразилии, Индии и Китае, и особенно в Японии и США создаются фирмы, которые на основе методов биотехнологии организовывают производство кормов, продуктов питания, медицинских препаратов, переработку производственных отходов и т. д.

В настоящей монографии обобщены результаты многолетних исследований по биотехнологии хлопчатника, проведенных с 1981 г. по настоящее время в лабораториях «Биотехнология хлопчатника» и «Биохимия и физиология» Узбекского научно-исследовательского института селекции и семеноводства хлопчатника.

В течение этого периода нами изучалась природа несовместимости при разнохромосомной гибридизации хлопчатника, разрабатывались методы ее преодоления действием экзогенных фитогормонов для получения гибридных семян; проводились сравнительные исследования модельных систем, к которым относятся агаризованные и суспензионные культуры, чтобы раскрыть некоторые аспекты влияния засоления на жизнедеятельность растений; определялись возможности применения культуры тканей и клеток для селекционно-генетических исследований при создании солеустойчивых растений. Приведены также данные по устойчивости к хлоридному засолению у ряда новых линий хлопчатника, полученных с помощью традиционных и нетрадиционных методов селекции, а также морфо-хозяйственные показатели у перспективных линий и сортов, испытывающихся в системе Государственного сортоиспытания и размножающихся в элитно-семеноводческих фермерских хозяйствах республики.

ГЛАВА 2 КУЛЬТУРА *IN VITRO* ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ И ПЕРСПЕКТИВЫ ЕЁ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Благодаря новейшим открытиям молекулярной биологии и генетики, а также достижениям генной инженерии расширились нетрадиционные методы гибридизации – работы стали проводиться на клеточном уровне. Биотехнологические методы способствуют неограниченному вегетативному размножению растений, т.е. регенерации полноценного растения в условиях биотехнологических систем из группы клеток и даже из одной клетки. При культивировании в питательных средах растительные клетки способны в одних условиях неограниченно размножаться, быстро наращивать биомассу, в других – дифференцироваться, образовывать корешки, стебельки, листочки (в практике миниатюрное растение), а затем переходить к цветению и плодоношению, т.е. весь биологический цикл растения можно осуществлять в неполевых, контролируемых условиях биотехнологических систем.

Культивируемые растения страдают от сорняков, грызунов, насекомых-вредителей, нематод, фитопатогенных грибов, бактерий, вирусов, неблагоприятных погодных и климатических условий. Перечисленные факторы, наряду с почвенной эрозией и градом, значительно снижают урожайность сельскохозяйственных растений. Известно, какие разрушительные последствия в картофелеводстве вызывает колорадский жук, а также гриб *Phytophthora* – возбудитель ранней гнили (фитофтороза) картофеля. Кукуруза подвержена опустошительным «набегам» южной листовой гнили, ущерб от которой в США в 1970 г. был оценен в 1 млрд. долларов. В последние годы большое внимание уделяют изучению вирусных заболеваний растений. Наряду с болезнями, оставляющими видимые следы на культурных растениях (мозаичная болезнь табака и хлопчатника, зимняя болезнь томатов), вирусы вызывают скрытые инфекционные процессы, значительно снижающие урожайность сельскохозяйственных культур и ведущие к их вырождению.

Биотехнологические пути защиты растений от рассмотренных вредоносных агентов включают: 1) выведение сортов растений, устойчивых к неблагоприятным факторам; 2) химические средства борьбы (пестициды) с сорняками (гербициды), грызунами (ра-

тициды), насекомыми (инсектициды), нематодами (нематоциды), фитопатогенными грибами (фунгициды), бактериями, вирусами; 3) биологические средства борьбы с вредителями, использование их естественных врагов и паразитов, а также токсических продуктов, образуемых живыми организмами. Наряду с защитой растений ставится задача повышения продуктивности сельскохозяйственных культур, их пищевой (кормовой) ценности, задача создания сортов растений, растущих на засоленных почвах, в засушливых и заболоченных районах. Разработки нацелены на повышение энергетической эффективности различных процессов в растительных тканях, начиная от поглощения кванта света и кончая ассимиляцией CO_2 и водно-солевым обменом. Традиционные подходы к выведению новых сортов растений - это селекция на основе гибридизации, спонтанных и индуцированных мутаций. Методы селекции не столь отдаленного будущего включают генетическую и клеточную инженерию.

С помощью методов клеточной инженерии протопласты разных растений сливают друг с другом и получают из них новые гибриды. Эти методы расширили границы спектра скрещиваемых растений, куда вошли не скрещивающиеся в природе виды. Однако техническая возможность соединения клеток очень отдаленных видов растений затруднена из-за преодоления их биологической несовместимости, поэтому не все гибриды могут сохраняться. В культуре хлопчатника межвидовые гибриды получали и раньше, но по ряду комбинаций сделать это традиционными методами практически невозможно из-за трудностей, возникающих в процессах опыления и оплодотворения.

Более широкое практическое применение в настоящее время получило другое важнейшее направление современной биотехнологии — **клеточная селекция** как метод создания новых форм растений путем выделения мутантных клеток и соматоклональных вариаций в селективных условиях. Клеточная селекция является как бы развитием мутационной селекции, но реализуется на уровне единичных клеток с использованием техники *in vitro*, что придает ей, с одной стороны, более широкие возможности, а с другой — создает значительные трудности из-за необходимости регенерации из отдельных клеток полноценных растений [60, 98, 166, 181, 182]. Преимущество клеточной селекции перед традиционными

методами состоит в отсутствии сезонности в работе, возможности использования миллионов клеток при отборе, направленности селекции путем применения селективных сред и выполнении работ в лабораторных условиях [190].

Хлопчатник занимает особое место в биотехнологии, включая культуру семян и клеток, а также развитие растений из клеток. Ценность использования методов культивирования тканей, клеток и протопластов *in vitro* определяется большими потенциальными возможностями в решении практических и фундаментальных задач биологии.

С развитием культуры *in vitro* появилась реальная возможность более широкого использования гаплоидии в селекции сельскохозяйственных культур. Применение метода культуры клеток позволило осуществить регенерацию растений из генеративных клеток, содержащих гаплоидный набор хромосом. Стало возможным массовое получение гаплоидов. Практическое значение в селекции в настоящее время получили культура пыльников (андрогенез), завязей и семян (гиногенез) и метод гаплопродюсера, который является разновидностью гиногенеза [41, 150].

Известно, что методы культуры тканей и клеток разработаны более чем для 50 видов лекарственных и сельскохозяйственных растений. Культура *in vitro* тканей растений, хотя и является более молодым разделом в области физиологии, тесно связана с практикой.

По культуре тканей и клеток растений в настоящее время проводятся исследования в нескольких направлениях:

2.1. Культура *in vitro* зародышей и органов растений

Важным аспектом *in vitro* является метод изолированной культуры зародышей, который позволяет получить новые хозяйственно-ценные формы растения. Выращивание зародышей в искусственной питательной среде называется **эмбриокультурой**. Среда для выращивания зрелого зародыша может быть простой, без добавок физиологически активных веществ (например, среда Уайта) или любая другая, содержащая минеральные соли и сахарозу. При более отдаленных скрещиваниях нарушения в развитии зародыша могут наблюдаться уже на ранних этапах, что выражается в отсутствии дифференцировки, замедленном росте. В этом случае куль-

тура зародыша состоит из двух этапов — эмбрионального роста зародыша, во время которого продолжается его дифференцировка, и прорастания подросшего зародыша. Для первого этапа требуется более сложная по составу среда с повышенным содержанием сахарозы, с добавками различных аминокислот, витаминов и гормонов.

Применение эмбриокультуры в селекции приобретает в последнее время большое значение для получения отдаленных гибридов зерновых, злаковых и других сельскохозяйственных культур. Показана возможность увеличения выхода пшенично-ржаных гибридов путем дорастивания незрелых зародышей, а также использования эмбриокультуры для преодоления постгамной несовместимости при гибридизации пшеницы с колосняком.

Метод эмбриокультуры находит все более широкое применение в межвидовой гибридизации овощных растений. Для лука разработаны приемы выращивания *in vitro* абортивных зародышей от гибридных семян с разных этапов эмбриогенеза, выращивание зародышей от частично фертильных межвидовых гибридов. Культура изолированных зародышей используется в селекции томатов и других овощных растений [184, 278].

Исследована гормональная регуляция роста и развития зародышей томата *in vitro*. Обсуждается возможность применения эмбриокультуры для получения отдаленных гибридов подсолнечника, изучаются факторы, контролирующие рост и развитие *in vitro* зародышей подсолнечника, выделенных в разные сроки после опыления.

Культура изолированных зародышей как вспомогательный метод при отдаленной гибридизации применяется не только для преодоления постгамной несовместимости, но также с целью микро-размножения ценных гибридов. В этом случае микро-размножение идет путем каллусогенеза, индукции морфогенеза и получения растений-регенерантов из каллусной ткани. Техника клонирования незрелых зародышей позволяет размножать ценные генотипы растений на ранних стадиях жизненного цикла. Еще одна возможность применения культуры зародышей — использование ее в клеточной селекции.

Невозможность осуществления межвидовых скрещиваний очень часто связана с приостановкой развития гибридного зародыша, что в свою очередь может быть обусловлено либо его ранней гибелью,

либо дегенерацией эндосперма. При скрещивании, например, *Linum perenne* $\times$ *L. ostriacum* развились коробочки, содержащие сморщенные семена, не способные к прорастанию в почве. Однако изолированные из них зародыши проросли после того, как их замачивали в растворе сахарозы и размещали на поверхности ваты. Благодаря использованию культуры зародышей удалось существенно увеличить число гибридов. На основе этой методики получены межвидовые гибриды *Abeltochus* и *Secale* и ряд межвидовых гибридов: *Hordeum vulgare* Linn и *Bowden* $\times$ *Agropyron repens* (Linn).

Целесообразно введение в культуру зародышей, полученных в результате отдаленных скрещиваний, когда наблюдается несовместимость родительских форм, ведущая к образованию маложизнеспособных или нежизнеспособных гибридных семян.

Наиболее разработанными для хлопчатника также являются методы культуры зародышей и семяпочек при отдаленной межвидовой гибридизации. В лаборатории биохимии и физиологии УзНИИССХ в последние годы с помощью эмбриокультуры получены отдаленные межвидовые гибриды хлопчатника и их беккросс-потомство. На протяжении ряда лет они изучались на устойчивость к стресс-факторам внешней среды, отбирались индивидуальные растения с наилучшими хозяйственно-ценными показателями, по результатам которых они высевались для дальнейших исследований.

Описываемый метод позволяет повысить эффективность отдаленных скрещиваний, получить новые ценные гибриды растений, что в естественных условиях не удается. Кроме того, культура семяпочек имеет огромное значение при преодолении нескрещиваемости отдаленных видов. При этом обычно используется опыление и оплодотворение семяпочек в пробирках, исключая путь пыльцы от рыльца пестика до семяпочек. Такие успехи пока достигнуты лишь для отдельных видов растений.

2.2. Культура меристем растений

В 1949 г. А.Лимассе и Д.Корнюз обнаружили, что меристематические ткани растений часто не содержат вирусов. Используя этот факт, Н.Морел и А.Д.Мартин в 1952 г. предложили получить оздоровленные растения из культивируемой *in vitro* меристемы. В дальнейшем оказалось, что метод культуры меристем, как и ряд

других методов культуры тканей, может с успехом применяться для размножения ценных, редких и медленно размножающихся форм растений. В настоящее время это направление в культуре тканей быстро развивается и является чрезвычайно перспективным. Используя эти методы, из одного материала в год можно получать до 1 миллиона растений.

2.3. Культура каллусных клеток

Каллусные культуры, полученные из сегментов или частей различных органов растений и выращиваемые на агаризованной среде, а также суспензионные культуры представляют собой единичные клетки или небольшие клеточные агрегаты. Растительные культуры *in vitro* не являются однородной клеточной системой, как это предполагалось ранее. В настоящее время существует большой фактический материал, демонстрирующий морфологическую изменчивость клеток в таких культурах. Многими авторами описана вариабельность форм и размеров клеток табака. В суспензионной культуре *Nicotianum tabacum* размеры клеток колебались от 50 до 240 мкм. Величина клетки и ее различная размерность в одном генотипе зависит от возраста растений, пloidности и многих других факторов.

Известно, что клетки, как и целый организм, могут приспосабливаться к условиям среды. В одиночно живущих клетках не существует тканевого барьера, и кроме этого, как упоминалось, свободно живущие клетки часто имеют разную пloidность и отличаются повышенной спонтанной мутационной способностью. Все это представляет большой интерес с точки зрения селекции клеточных культур.

В настоящее время клеточная селекция сельскохозяйственных растений развивается очень успешно. Например, в России получена линия риса, исходная форма которой была высокорослой, полегаемой, малоурожайной и с низким качеством продукции. Из неё посредством клеточной селекции получен низкорослый, высокоурожайный, неполегаемый, с высокими вкусовыми качествами сорт риса. Или, например, под руководством проф. Б.П. Строгонова (ИФР АН России) получены каллусные клетки, устойчивые к засолению, т.е. к 0,7% Na_2SO_3 , тогда как контроль был устойчив к

0,01 %. Клеточная селекция может быть использована для создания сортов, устойчивых к болезням, засолённости почвы, холоду и к ряду других неблагоприятных факторов.

В клеточной селекции с успехом можно использовать оголенные протопласты и клетки микроспор и пыльников.

Каллусные клетки также можно применять для размножения уникальных форм, линий, гибридов и др. Например, у люцерны, по данным А.В. Мезенцева и др. [126], в год можно получить из одной суспензии каллусных клеток до 1 миллиона растений в год.

Культура свободно живущих клеток в настоящее время широко используется в биотехнологии для получения лекарственных веществ, каучука, витаминов и др. Большие успехи достигнуты по биотехнологии каллусных культур женьшеня. Ее продукция сейчас используется для изготовления кормов, кремов и т.п.

В селекции растений часто применяется явление гаплоидии для получения гомозиготных линий. Гаплоид и дальнейший перевод его в дигаплоид представляет большой интерес с точки зрения сокращения селекционных процессов и получения чистых гомозиготных однообразных линий сельскохозяйственных растений. Получение гомозиготных линий непосредственно из F_2 особенно важно для селекции зерновых культур. При этом облегчается поиск ценных в практическом отношении генотипов, возникающих в результате рекомбинации генетических факторов родительских форм, что повышает скорость и надежность отбора.

Получение в культуре *in vitro* гаплоидных клеток андрогенезом представляет большие трудности. Чаще всего выход гаплоидных клеток у культурных растений в среднем варьирует от 0,03 до 0,07 %. Получение высоких процентов гаплоидных растений возможно путем партеногенеза. Например, используя гаплопродуцера у ячменя *H. bulbosum*, С.Ф. Лукьянюк [122] удалось получить выход от 2,7% до 25% в зависимости от генотипа и условий выращивания. Им удалось получить 260 дигаплоидных линий, из них 19 линий успешно прошли конкурсное сортоиспытание, одна – госсортоиспытание.

2.4. Культура тканей

Относительно молодые направления в культуре тканей *in vitro* – культура оголенных протопластов и парасексуальная гибриди-

зация начали бурно развиваться с начала 80-х годов прошлого столетия и за короткое время достигли больших успехов. Сущность данных способов гибридизации заключается в том, что в качестве родительских клеток для гибридизации используются не половые клетки (гаметы), а клетки тела (сомы) растений. У таких клеток с помощью ферментной обработки удаляют жесткие полисахаридные оболочки и «голые» клетки, выделенные из родительских организмов, при определенном экспериментальном воздействии заставляют сливаться друг с другом.

Из гибридных клеток, полученных путем слияния, в дальнейшем регенерируют целые растения-гибриды. Так, путем слияния соматических клеток по сообщению Ю.Ю.Глебы [75] получено 12 внутривидовых гибридов, из которых 8 гибридов между различными сортами табака, еще 2 гибрида петунии и датуры.

Таким образом, мы остановились на основных направлениях культуры тканей *in vitro*, используемых в практической селекции.

Несмотря на то, что возможности традиционной селекции использованы еще далеко не полностью, полученные результаты не отвечают современным требованиям из-за медленного темпа, связанного со сменой поколений, большого объема и трудоемкости селекционных экспериментов, нередко косвенных, неточных и даже интуитивных методов оценки селекционного материала. К этому следует добавить, что в ходе интенсивной селекции генетические ресурсы культивируемых видов хлопчатника в значительной степени исчерпаны. Одним из наиболее эффективных источников нового формо- и видообразования является отдаленная межвидовая гибридизация. Однако существуют препятствия, связанные с получением семян и растений из-за межвидовой несовместимости, устранение которых методами традиционной селекции невозможно. В связи с этим возникает необходимость изменить подходы в селекции этой культуры и других растений. Целесообразно перенести основное внимание на физиологические, биохимические, экологические и генетические аспекты повышения продуктивности и устойчивости растений с привлечением генетических ресурсов более далеких в систематическом отношении организмов.

ГЛАВА 3 РОСТ И РАЗВИТИЕ *IN VITRO* НЕДОЗРЕЛЫХ ГИБРИДНЫХ ЗАРОДЫШЕЙ ХЛОПЧАТНИКА

Известно, что из существующих более 50 видов хлопчатника [11], диплоидные виды *G. arboreum* L., *G. herbaceum* L., *G. anomalum* Waw., *G. thurberi* Tod., *G. davidsonii* Kell., *G. klotzschianum* Anderss., *G. aridum* Skov., *G. armourianum* Kear., *G. harknessii* Brand., *G. sturtii* F.Muell., *G. australe* F.Muell., *G. raimondii* Ulbr., *G. bickii* Prokh. представляют практический интерес для селекции хлопчатника как доноры устойчивости к вилту, бактериозу, корневой гнили, засолению, засухе, кратковременным заморозкам, яссаде, паутинному клещику, тле и др. Кроме того, некоторые из них имеют крепкое и тонкое волокно и др. [10, 124].

Вовлечение их в гибридизацию с культивируемыми видами представляет большое практическое значение для селекции хлопчатника. При гибридизации отдаленных видов можно наблюдать нормальное оплодотворение яйцеклетки [42, 231]. Однако на дальнейших стадиях эмбриогенеза в развитии зародыша наблюдаются нарушения из-за неправильного роста гибридного эндосперма [301].

Как отмечал Ф.М.Майер [124], формообразовательный процесс при гибридизации диких диплоидных видов с тетраплоидными культивируемыми видами хлопчатника представляет огромный интерес для практической селекции. Однако не все дикие виды хлопчатника дают жизнеспособные гибридные семена при гибридизации их с культивируемыми формами, видами. Так, при скрещивании тетраплоид x диплоид гибридные зародыши часто погибают очень рано - на 5-6 день после опыления, а при обратном скрещивании (диплоид x тетраплоид) зигота развивается до 13-15 дней после опыления, но дифференцируется ненормально - гибридный зародыш развивается без осевых органов. В дальнейшем развитие гибридных зародышей прекращается, и они погибают [35, 301].

Для предотвращения ранней гибели эмбриона при отдаленной гибридизации у многих сельскохозяйственных культур успешно применяется метод культуры зародышей. Этот метод дал очень хорошие результаты в получении гибридных растений при отдаленных межвидовых скрещиваниях груши [201], вишни [194], черешни, миндаля [92], яблони [57], томата [184], подсолнечника [225] и др.

Для некоторых культур, например, табака, риса, картофеля, ячменя, люцерны разработаны методы культуры *in vitro* изолированных семяпочек, зародышей, каллусных клеток, протопластов [122, 126, 265, 298], с помощью которых получены ценные сорта и гибриды. Кроме того, по вышеназванным культурам проводились клеточная селекция [125, 337, 338], парасексуальная гибридизация [289, 324]. С использованием культуры пыльников были получены гаплоидные растения. Отдаленные межвидовые и межродовые гибриды получены с помощью методов культуры семяпочек и зародышей *in vitro* [40, 254, 255, 309].

Для представителей некоторых культур методы культуры тканей *in vitro* разработаны слабее. Это связано с трудной регенерационной способностью клеток этих растений. В частности, к таким видам относится и хлопчатник. Имеется целый ряд работ по культуре изолированных клеток и органов хлопчатника [7, 16, 21, 22, 28, 32, 34, 35, 118, 178, 218, 219, 278, 281, 321, 330, 331, 332].

В исследованиях С.В.Льва и др. [118] и R.C.Shookmaker et al. [314] показана возможность регенерации из каллусных культур сортов вида *G.hirsutum* L. Однако эти исследования пока единичны, оптимальные методы по соматическому эмбриогенезу для культивируемых видов хлопчатника по данным доступной нам литературы еще не разработаны.

Первые исследования по культуре незрелых зародышей хлопчатника *in vitro* были проведены S.A.Beasley [214]. Им была использована среда Уайта для культивирования незрелых гибридных зародышей *G.arboreum* L. x *G.herbaceum* L. При этом зародыши имели овально-глобулярную форму и на искусственной среде не переходили к росту. Культивируя разновозрастные зародыши хлопчатника, G.R.Mauney [273] предположил, что для перехода к росту зародыши должны быть дифференцированы на осевые органы. Им была предложена питательная среда, содержащая высокую концентрацию NaCl (7 г/л) и аденина сульфата (40 мг/л), а также 150 мг/л коммерческого препарата кокосового молока. На этой среде через 3-4 недели зародыши постепенно переходили к росту.

Для роста гибридных зародышей более упрощенную среду, содержащую низкую концентрацию основных макроэлементов из состава

из сред MS и витамины по BT (1973), 2% сахарозы, предложили J.Mc.D.Stewart и C.L.Hsu [321]. На этой среде хорошо растут дифференцированные зародыши размером 3-5 мм.

В литературе имеется ряд сообщений M.S.Gill и G.P.Bajaj [244, 245, 246] по использованию методов культуры зародышей для получения гибридных растений между диплоидными видами хлопчатника.

В вышеуказанных работах многие среды подобраны эмпирически, и поэтому влияние основных элементов питательной среды на рост зародышей *in vitro* изучено недостаточно. В данном разделе представлены результаты исследований по культуре недоразвитых зародышей сортов и гибридов хлопчатника.

Для культивирования использованы зародыши от 14 до 30-дневного возраста сортов хлопчатника 108-Ф, Ташкент-1, С-4727 (*G.hirsutum* L.), С-7059 (*G.arboreum* L.), 2929, 0144 кат. номер (*G.herbaceum* L.); 20-25-дневные гибридные зародыши *G.arboreum* L. x *G.hirsutum* L., *G.herbaceum* L. x *G.hirsutum* L., эти же гибридные зародыши, полученные после культивирования 3-6-дневных семяпочек после опыления [15, 16].

Питательные среды готовили по Р.Г.Бутенко [59]. Скрещивание между видами проводили обычным методом, принятым в селекции растений, летом — в поле, зимой — в теплице. Критерием оценки экспериментов служили данные визуального метода наблюдений. В вариантах, где зародыши переходили к росту, определяли пропорциональное развитие осевых органов, размеры корня, гипокотили, появление настоящих листочков.

Результаты культивирования незрелых зародышей показали, что на известных классических средах *Murashige-Scoog*, *B-5 Gamborg*, *Stewart-Hsu* зародыши хлопчатника развиваются в нежелательном направлении. На данных средах в первые дни культивирования они значительно увеличиваются в размере, после чего происходит их высыхание или в отдельных случаях семядольные листья зеленеют и осевые органы развиваются диспропорционально.

Более взрослые зародыши (18-дневные) сортов легко культивируются на среде *Nich-Nich* и на разбавленной среде *Stewart-Hsu*. Однако гибридные зародыши на этих средах не развиваются. Гибридные зародыши отличаются от сортовых своей формой. У сортовых зародышей на 14-15-й день после опыления, т.е. с момента

формирования осевых органов, отмечаются семядольные листья полукруглой формы. Нормально сформированные гибридные зародыши, полученные культивированием 5-6-дневных оплодотворенных семязпочек, имеют удлиненную форму, твердую белую ткань, классически сформированный корешок, вместо семядольных листьев - бугорки, напоминающие лепестки тюльпана. Из последних *in vitro* вначале растут аномальные листья, затем из точек роста начинается нормальное развитие. Из гибридных зародышей в редких случаях развиваются нормальные семядольные листья. При культивировании оплодотворенных семязпочек гибридные зародыши формируются почти одинаково, независимо от направления скрещивания. Это связано, во-первых, с отсутствием эндосперма при культивировании семязпочек, во-вторых, с разрастанием внутренних и наружных интегументов.

Гибридные зародыши хлопчатника, в отличие от зародышей многих культур, очень требовательны к составу питательных сред. В связи с этим важным условием для успешного выращивания незрелых гибридных зародышей является создание оптимального сочетания питательных веществ. Поиск питательных сред, в основном, вели эмпирически, с использованием решетки Пеннета, при различной концентрации элементов питательной среды.

Фитогормоны. У многих сельхозкультур для роста незрелых гибридных зародышей *in vitro* часто используют различные фитогормоны.

Использование фитогормонов класса цитокининов, ауксинов и гиббереллинов приводит к пропорциональному росту осевых органов зародышей у косточковых, однодольных, травянистых и других растений. Незрелые зародыши хлопчатника, в основном, отрицательно реагируют на присутствие фитогормонов в питательной среде. Цитокинины (кинетин, БАП, аденин) при наиболее низкой (0,01-0,1 мг/л) или высокой концентрации (1-10 мг/л) затормаживают рост дифференцированных зиготических зародышей. Из ауксинов только НУК стимулирует рост зародышей. В среде с НУК зародыши постепенно переходят к росту, гипокотиль и корень увеличиваются пропорционально; на 30-й день культивирования образуются проростки размером 1 см. Дальнейшее развитие растений прекращается, и они высыхают. Аномальные листья зародышей на среде с ИУК зеленеют, а корешок дегенерирует. Наличие 2,4-Д в среде всегда приводит

к высыханию зародышей. Необходимо отметить, что в контрольных вариантах, т.е. на среде без фитогормонов, зародыши всегда лучше переходили к росту, чем в опытах с наличием фитогормонов. На основании многолетних опытов был сделан вывод, что экзогенные фитогормоны, в основном, не стимулируют рост изолированных гибридных зародышей хлопчатника. А чаще всего, присутствие их либо подавляет рост гибридных зародышей, либо приводит к диспропорциональному развитию осевых органов. Это, в свою очередь, говорит о том, что присутствие экзогенных фитогормонов в питательной среде не обязательно для нормального перехода незрелых гибридных зародышей к росту. Эти выводы распространяются только на зиготические зародыши хлопчатника, дифференцированные *in vivo* или *in vitro*. Для роста соматических зародышей С.В.Лев и др. [118] успешно применяли низкие концентрации фитогормонов НУК, Дропп и гибберелловую кислоту.

Почти во всех работах по культивированию зиготических зародышей хлопчатника из состава питательной среды исследователи исключали фитогормоны [208, 209, 321]. Возможно, что дифференцированные зиготические зародыши более предрасположены к самостоятельному росту без участия регуляторов, нежели соматические зародыши.

Витамины. В отличие от фитогормонов витамины играют большую роль в развитии зиготических гибридных зародышей на искусственных питательных средах *Beasley-Ting*, *Stewart-Hsu*, *Mauney*, *Bajaj* и др. При культивировании тканей хлопчатника использовали витамины группы В и никотиновую кислоту. Витамины тиамин-НCl, пиридоксин-НCl и никотиновая кислота в наших исследованиях изучены как отдельно, так и в различных сочетаниях и концентрациях по *White*, *Nich-Nich*, *Murashige-Scoog*, *Beasley-Ting*, *Stewart-Hsu*.

В средах с отдельными витаминами и различными их сочетаниями и концентрациями (0,1-1,0 мг/л) развитие зародышей происходит крайне редко. Наибольший выход растений наблюдается в вариантах с сочетанием трех витаминов в среде. Витамины по *MS* и *BT* эффективно действуют на рост гибридных зародышей хлопчатника. Гибридные зародыши *G.arboreum* L. x *G.hirsutum* L. лучше развиваются на среде с витаминами по *MS*. При этом выход растений больше (65%), чем в других вариантах. Для гибридных

зародышей *G. herbaceum* L. x *G. hirsutum* L. более оптимальными оказались витамины по *BT*, где выход растений достиг 76 %. Здесь показано, что при одном и том же составе витаминов рост различных генотипов зависит от концентрации витаминов.

В наших исследованиях при разработке единой питательной среды для роста незрелых гибридных зародышей хлопчатника состав витаминов и их концентраций подобран на основании результатов, полученных при применении распространенных и описанных в литературе известных сред с витаминами.

Углеводы. При культивировании изолированных тканей и органов хлопчатника в составе питательной среды из углеводов чаще всего используют глюкозу или сахарозу. Концентрация последних, в основном, варьирует в пределах 2-4%. В наших исследованиях использовались сахароза, глюкоза, лактоза, мальтоза, маннит и крахмал.

Результаты исследований показали, что в питательных средах с 3%-ной лактозой и мальтозой только 10-20% зародышей переходят к росту. При этом полученные растения очень хилые и растут медленно. В средах с маннитом и крахмалом рост незрелых зародышей хлопчатника вообще не наблюдался.

Для роста гибридных зародышей оптимальными вариантами были питательные среды с содержанием глюкозы и сахарозы. На средах с сахарозой отмечен лучший рост незрелых зародышей, чем на средах с глюкозой.

При низкой концентрации сахарозы (0,5-1,0%) в среде рост зародышей не наблюдался. На среде же с 2%-ной сахарозой семядольные листья приобретали зеленый цвет, увеличиваясь в размере, а корешки не росли. Для пропорционального развития осевых органов зародышей оптимальной оказалась 3%-ная концентрация сахарозы. На такой среде через 3-4 дня после посева начинали активно расти корешки. К 18-20 дню корень достигал 3-6 см, гипокотиль 2-4 см. Настоящие листья появлялись на 25-30-день культивирования. Такие зародыши хорошо переходили в рост и на среде с 4-5%-ной сахарозой, но при этом корень развивался очень медленно и достигал всего 1,5-2,0 см. В средах с более высокой концентрацией сахарозы (7-12%) зародыши обычно высыхали.

Макроэлементы. Для культуры зародышей хлопчатника изучали влияние макроэлементов, входящих в состав среды *MS*. В сре-

дах *MS*, *BT*, *B-5 Gamborg* и др., где концентрации KNO_3 и NH_4NO_3 составляли более 1,5 г/л, гибридные зародыши хлопчатника в первые дни переходили к росту, но через некоторое время прекращали рост и высыхали.

По нашим наблюдениям, рост зародышей хлопчатника на искусственной среде, в основном, зависел от концентрации KNO_3 и NH_4NO_3 . Изменение концентраций таких соединений, как $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ и KH_2PO_4 существенного влияния на рост изолированных зародышей хлопчатника не оказывали, хотя более низкая концентрация этих макроэлементов все же положительно влияла на рост гибридных зародышей. При создании оптимальной питательной среды для культуры зародышей хлопчатника подбор компонентов среды и их концентраций проводился опытным путем. Опыты показали, что гибридные зародыши лучше растут в средах с KNO_3 и NH_4NO_3 в концентрации от 800 до 1000 мг/л, с витаминами по составу *MS* и с 3%-ной сахарозой. Концентрации $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ и KH_2PO_4 также были подобраны методом проб. Оптимальными концентрациями этих солей были: $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 180-220 мг/л, $\text{CaCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 140-480 мг/л, KH_2PO_4 – 60-100 мг/л.

Микроэлементы. При культивировании гибридных зародышей хлопчатника использовали, в основном, микроэлементы по *MS*. По литературным и полученным нами экспериментальным данным, повышение концентрации H_3BO_3 до 10 мг/л эффективно влияет на рост зародышей хлопчатника. Исключение из состава среды микроэлементов $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ на развитии гибридных зародышей при культивировании *in vitro* никак не сказывается.

Миоинозит. Миоинозит – источник углерода – используется как стимулятор и витамин при культивировании растительных тканей *in vitro*. Однако концентрация миоинозита в питательных средах в несколько десятков раз больше, чем стимуляторов роста и витаминов [59]. При культивировании семяпочек и незрелых зародышей хлопчатника *in vitro* особое внимание исследователи [231, 321] обращают на присутствие миоинозита в питательной среде. Присутствие его в среде при морфогенезе незрелых зародышей хлопчатника подавляет рост стеблевых почек и препятствует ризогенезу [321]. В опытах N.S.Pundir [231] без миоинозита *in vitro* зародыш в семяпочках не дифференцировался и не переходил к морфогенезу.

Для определения участия миоинозита в морфогенезе незрелых зародышей хлопчатника мы исследовали 13-, 14-, 15-, 16- и 30-дневные незрелые зародыши сорта Ташкент-1. При их культивировании руководствовались методом Здруйковской-Рихтер [93]. Использовали среду Beasley-Ting [217] и некоторые разработанные нами модификации. Миоинозит использовали в концентрациях 20, 40, 80, 120 мг/л и контрольный вариант – без миоинозита. Зародыши культивировали в факторостатном помещении при температуре 30°C, влажности – 70%, освещенности – 2-3 тыс. люкс.

Время перехода к морфогенезу незрелых зародышей хлопчатника зависит от их возраста. Например, 30-дневные зародыши в питательной среде начинают расти с третьего по 30-й день культивирования, т.е. отмечается широкий диапазон варьирования времени перехода к морфогенезу. Дифференцированные 13-14-дневные зародыши обычно переходят к росту через 20, 30 и даже 40 дней. Наиболее хорошими морфогенетическими способностями отличались 15-16-дневные зародыши с нормально сформированными осевыми органами. Они приступали к росту через 15 дней культивирования, причем довольно стабильно (± 1 день). Поэтому действие миоинозита изучали на 16-дневных незрелых зародышах хлопчатника.

Результаты исследований показали, что в питательной среде без содержания миоинозита незрелые зародыши хлопчатника *in vitro* переходят к морфогенезу, однако при этом наблюдается их аномальное развитие. Во многих случаях точка роста не развивается и растения ограничиваются лишь образованием семядольных листьев. В средах без содержания миоинозита и витаминов морфогенез незрелых зародышей наблюдается крайне редко. Присутствие миоинозита (40 мг/л) в среде в первые дни роста существенно влияет на развитие гипокотилия. К 20-, 25-дню культивирования зародышей миоинозит оказывал несущественное влияние ($F_z > F_{\phi}$). С 30-го дня культивирования при концентрации миоинозита 40 мг/л гипокотиль значительно увеличивался в размере, что продолжалось до 35-50-го дня культивирования. Анализ полученных данных показал, что высокие концентрации миоинозита (80-120 мг/л) существенно не влияют на рост гипокотилия.

На рост корня незрелых зародышей хлопчатника различные концентрации миоинозита влияют несколько иначе. С первых дней

морфогенеза корневая система растений хорошо развивается в агаризованной среде. При этом влияние миоинозита едва заметно, по сравнению с контрольным вариантом. С 25- и 30-го дней культивирования и только при концентрации 40 мг/л корень продолжает интенсивно расти, тогда как в двух других вариантах, при концентрациях миоинозита 80 и 120 мг/л, значительно снижается активность корневого роста.

Таким образом, миоинозит при определенных концентрациях существенно влияет на морфогенез незрелых зародышей хлопчатника, рост гипокотилия и корня *in vitro*. Важно отметить, что при 40 мг/л миоинозита в среде достоверно повышается рост гипокотилия и корня. Поэтому для культивирования незрелых зародышей хлопчатника *in vitro* в разбавленную среду Бисли - Тинга следует добавлять 40 мг/л миоинозита [28].

Fe-хелат. Fe-хелат, состоящий из двух элементов, применяли в концентрации, использованной в среде MS.

Аминокислоты. Из аминокислот на рост незрелых гибридных зародышей хлопчатника очень эффективно влияют глицин в двойной дозе по MS. Влияние остальных аминокислот не изучено, так как без них можно получить нормальный рост и развитие зародышей хлопчатника.

На основании изучения основных элементов искусственного питания нами подобрана оптимальная питательная среда для культуры незрелых, дифференцированных на осевые органы, гибридных и сортовых зародышей хлопчатника. Данная питательная среда названа средой Азизходжаева и состоит из следующих элементов:

Компоненты среды	Концентрация, мг/л	Компоненты среды	Концентрация, мг/л
KNO ₃	810,0	KI	0,83
NH ₄ NO ₃	800,0	Тиамин-HCl.....	0,2
CaCl ₂	166,0	Пиридоксин-HCl.....	0,8
MgSO ₄	200,0	Никотиновая кислота.....	0,6
KH ₂ PO ₄	70,0	Инозит.....	40,0
Fe хелат.....	5,0	Глицин.....	4,0
H ₃ BO ₃	10,0	Сахароза.....	30000,0
MgSO ₄ x 4H ₂ O.....	22,3	Агар-агар.....	8000,0
ZnSO ₄ x 7H ₂ O.....	8,6	ph.....	5,5-5,6

3.1. Пересадка в грунт пробирочных растений, полученных методом эмбриокультуры

При гибридизации тетраплоидных видов хлопчатника с дикими диплоидами, в основном, встречаются два вида нескрещиваемости – ранняя гибель зародыша и стерильность гибридов. Так, при гибридизации *G.arboreum* L. x *G.hirsutum* L., *G.herbaceum* L. x *G.hirsutum* L. мы культивировали *in vitro* 3-6-дневные после опыления семяпочки, с последующим вычленением и культивированием дифференцированных гибридных зародышей на искусственной питательной среде. В итоге работ были получены гибридные пробирочные растения [22].

Полученные в пробирках гибридные растения имели нормально развитые стебли и листья, но корни чернели и некротировали. Использованием 5%-ного активированного древесного угля в составе питательной среды удалось сохранить нормальное развитие корней. Несмотря на это, развития гибридных растений после пересадки их в грунт получить не удалось.

Результаты дальнейших исследований показали, что в течение 20-30 дней растения растут интенсивно и достигают размеров стебля 2,5-3,5 см, корня – 4-5 см. Затем опять наблюдается почернение корней, но при этом растения в пробирках не погибают, а продолжают развитие в течение 4-6 месяцев до появления вторичных корней (белого цвета). Последние разрастаются в тех местах, где нет соприкосновения их со средой. После пересадки таких растений в грунт в течение 10-15 дней они сохраняют нормальное тургорное состояние, однако в дальнейшем постепенно высыхают.

Результаты многолетних исследований по пересадке гибридных растений в грунт показали, что даже те растения, которые имеют белые корни с хорошо сформированными сосущими волосками, не приживаются в различных смесях почвы. Возможно, это связано с тем, что пересаживаемые растения не имеют запасных веществ для вторичного ризогенеза.

Использование различных концентраций фитогормонов также не привело к положительным результатам. Обработка гибридных проростков различными концентрациями ИУК, НУК, гибберелловой кислоты, кинетина, 6-БАП в среде Кноппа не вызывала отращения вторичных корней. Это еще раз подтверждает, что отсутствие

запасных веществ в проростках затрудняет процесс ризогенеза.

Дальнейшие исследования были направлены на разработку метода пересадки пробирочных растений в грунт. После проведения многочисленных изысканий и экспериментов нашими сотрудниками был разработан метод укоренения растений, перенесенных из пробирок в грунт, который состоял из нескольких этапов:

1. Аклиматизация пробирочных растений. Для этого пробки пробирок с растениями открываются, и в таком состоянии пробирки содержатся в факторостатном помещении в течение 6-8 дней.

2. Приготовление дополнительного питания для пробирочных растений. Средой, состоящей из KNO_3 в концентрации 100 мг/л; NH_4NO_3 – 100 мг/л; $CaCl_2 \times 2H_2O$ – 40 мг/л; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 40 мг/л; инозита – 20 мг/л; H_3BO_3 – 3 мг/л; $MnSO_4 \times 4H_2O$ – 4,1 мг/л; $ZnSO_4 \times 4H_2O$ – 2,0 мг/л; HP – 0,2 мг/л; $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ – 0,04 мг/л; $CuSO_4 \times 5H_2O$ – 0,01 мг/л; никотиновой кислоты – 0,2 мг/л; тиамин - HCl – 0,03 мг/л; пиридоксин - HCl – 0,2 мг/л; сахарозы – 30 г/л, заполняем сосуд капельницы с продернутой в нее нитью для соединения ее с растением.

3. Введение среды в растение для обеспечения его дополнительным питанием. Для этого адаптированные растения в асептических условиях вынимаются из пробирок. С помощью иглы через стебель над корневой шейкой продергивается нить, один конец которой находится в питательной среде. Место прикосновения носика капельницы с растением закрепляется парафином.

4. Высев пробирочных растений в грунт. Для этого растения, прикрепленные к капельницам, высаживаются в бумажные стаканчики с песком, а капельница устанавливается рядом на том же уровне, что и растение. Сверху растения накрывают стаканом для поддержания влажности. В таком положении растения культивируются в факторостатном помещении при температуре $+26^\circ C$, освещенности 2-3 тыс. люкс, влажности воздуха 70%.

Высаженные таким способом растения начинают интенсивно расти, и, по истечении 1,5-2 месяцев уже окрепнувшие растения способны обходиться без дополнительного питания. На рис. 1 – растение через 1 месяц после пересадки, а на рис. 2 – через три месяца.

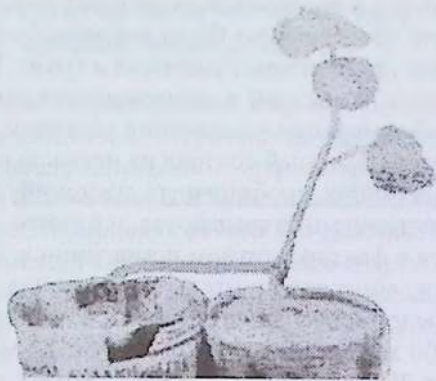


Рис. 1. Пересаженное в грунт растеньице вместе с сосудом (с дополнительным питанием)



Рис. 2. Гибридное растение $F_1 BC_1$ *G. hirsutum* L x F_1 (*G. hirsutum* L x *G. raimondii* Ulbr.) через 3 месяца после пересадки в грунт

Так, нами был разработан последний этап метода культуры недозревших зародышей хлопчатника, который рекомендуется для получения взрослых растений и семян.

ГЛАВА 4 РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПРЕОДОЛЕНИЯ НЕСКРЕЩИВАЕМОСТИ У ХЛОПЧАТНИКА С ПОМОЩЬЮ ЭКЗОГЕННЫХ ФИТОГОРМОНОВ

4.1. Явление несовместимости у двудольных растений

Известно, что при гибридизации отдаленных разнохромосомных видов трудности получения гибридных семян и растений связаны с нескрещиваемостью исходных форм. Нескрещиваемость наблюдается с момента попадания пыльцы на рыльце пестика до последнего этапа эмбриогенеза. Явление нескрещиваемости при отдаленной межвидовой гибридизации растений большинством исследователей разделено на несколько этапов:

- прогамная несовместимость;
- сингамная несовместимость;
- постгамная несовместимость.

Нарушения различных фаз оплодотворения приводит к опадению завязей или стерильности гибридов [42, 49, 50, 51, 53, 56, 69, 86, 146, 175, 213, 214, 230].

Прогамная несовместимость. Прогамная несовместимость при межвидовой гибридизации проявляется при взаимодействии мужского гаметофита и пестика в момент скрещивания. Это сложное и многоступенчатое явление, включающее этапы прикрепления пыльцы к поверхности рыльца, прорастания пыльцевых трубок в семязпочку и продвижения ядер мужского гаметофита в зародышевом мешке. В зависимости от культуры, генотипических различий, направлений скрещиваний наблюдаются различные типы прогамной несовместимости.

В момент попадания пыльцы на рыльце со стороны последнего наблюдается сопротивление к прорастанию пыльцы. Например, при несовместимом опылении пыльцевые трубки не способны проникать через кутикулу сосочков рыльца, поскольку кутинарушающая ферментативная система не активируется [122], или же в пыльце имеются водорастворимые высокодиффузионные факторы роста пыльцы, являющиеся белками или флавоноидными веществами, а рыльца у многих растений покрыты пелликулой, кон-

тролирующих, по мнению многих авторов [50, 69, 222], процесс несовместимости.

В случае же успешного проникновения пыльцевых трубок через рыльце в дальнейшем возникают всевозможные нарушения. Например, наблюдается замедление роста пыльцевых трубок до полной их остановки [49, 53]. Авторы обнаружили, что многие чужеродные пыльцевые трубки на разных участках столбика образуют вздутия, бульбы, повороты на 180° и, видимо, вследствие этого прекращают рост. Несмотря на это, в некоторых вариантах отдаленной гибридизации растений можно наблюдать нормальный рост единичных пыльцевых трубок, которые доходят до зародышевого мешка [42, 50, 53, 56, 86, 146, 231].

Сингамная несовместимость. Отдельные исследователи [49, 50, 86] особое внимание уделяют фазе гамогенеза или сингамной несовместимости, при которой достаточно часто спермии входят в яйцеклетку, но их слияния не происходит, либо спермии подходят к яйцеклетке, но не входят в её ядро, либо они остаются в синергидах и т.д.

Работы В.П.Банниковой [49-51], Е.Н.Герасимовой [243], О.А.Долговой-Хведынич [86] посвящены несовместимости при отдаленной межвидовой гибридизации растений, проявляющейся в момент оплодотворения, где показаны различные варианты нарушений, происходящие во время проникновения спермиев в синергиды и яйцеклетку.

Так, например, при скрещивании табака *Nicotiana glauca* x *N. paniculata* наблюдаются нарушения при прохождении спермиев через синергиды и до двойного оплодотворения [49, 50]. Имеются также данные о поведении спермиев в зародышевом мешке при отдаленной гибридизации между видами рода *Crepis* [243], где в 25% случаев спермии *C. tectorum* попадают в зародышевый мешок *C. capillaries* с обычной скоростью. Однако они не сливаются с женскими ядрами и дегенерируют, иногда может осуществляться оплодотворение лишь одного ядра яйцеклетки при дегенерации другого. В исследованиях О.А.Долговой-Хведынич [86] в данной комбинации скрещивания (*C. tectorum* x *C. capillaries*) наблюдаются картины задержки спермиев в синергидах до трех суток, тогда как в норме через 30 мин. после опыления спермии уже находятся в контакте с женскими ядрами.

Аналогичные картины прослеживали многие исследователи на различных культурах.

Постгамная несовместимость. При отдаленной межвидовой гибридизации, несмотря на многочисленные нарушения в прорастании пыльцы на рыльце, в прохождении пыльцевых трубок по столбику, в процессе оплодотворения все же наблюдаются нормально сформировавшиеся гибридные зиготы, способные к дальнейшему развитию. Однако формирование гибридных зародышей происходит с существенными отклонениями от нормы. Так, например, при гибридизации пшеницы с рожью, дурмана – с табаком первое деление зиготы либо не происходит, либо останавливается на стадии 2-3-клеточного проэмбрио. При гибридизации *Hordeum vulgare* x *Secale cereale* [51], *Triticum aestivum* x *Triticum monoccum* [86] нарушения начинаются на более раннем этапе. Здесь ядро зиготы вступает в профазу, но деление не всегда заканчивается, поскольку не формируется ахроматиновое веретено.

Исходя из данных многочисленных источников, можно сделать вывод, что аномалии в развитии гибридного зародыша проявляются на различных этапах эмбриогенеза, начиная с момента слияния гамет и кончая поздним этапом развития зародыша и эмбриогенеза [49, 50, 51].

По данным ряда отечественных и зарубежных исследователей, в большинстве случаев при отдаленной межвидовой гибридизации эндосперм не развивается, а зародыш развивается лишь до определенной стадии дифференциации [42, 93, 274, 301].

В таких случаях очень удачно применяются методы культуры зародышей *in vitro*, с помощью которых получены растения более 200 видов [15, 35, 93, 137, 176, 226, 273, 298].

При отдаленной межвидовой гибридизации хлопчатника также отмечается явление несовместимости, как и у других покрытосеменных растений. Существует множество работ, посвященных цитозембриологическим исследованиям при отдаленной межвидовой гибридизации хлопчатника [42, 43, 56, 69, 71, 95, 101, 163, 164, 214, 215, 316, 317].

Однако большинство исследований были проведены при реципрокных скрещиваниях старосветских диплоидных видов (*G. arboreum* L., *G. herbaceum* L.) с новосветскими тетраплоидами (*G. hirsutum* L., *G. barbadense* L.) [42, 56, 90, 91, 99, 214,

215, 256, 231, 317] и направлены на изучение филогении вида *G. hirsutum* L.

Л.Г.Арутюнова [42] установила, что пыльцевые трубки диплоидных старосветских видов *G. herbaceum* L. и *G. arboreum* L. хорошо растут в тканях пестика тетраплоидного новосветского хлопчатника *G. hirsutum* L. и даже в большом количестве проникают в завязь. В данной работе обнаружено, что в опыленной завязи *G. arboreum* L. x *G. hirsutum* L. в 85 % семянчиков развиваются зародыши. При обратном скрещивании также наблюдается большой процент (75%) завязываемости. Однако после 20-25 дней развитие зародыша прекращается при значительно ранней гибели эндосперма.

Индийским ученым N.Pundir [231] показано, что пыльца *G. hirsutum* L. растет на рыльце пестика *G. arboreum* L. значительно интенсивней, чем при обратном скрещивании. При гибридизации *G. arboreum* L. x *G. hirsutum* L. на третий день после опыления в семяпочке наблюдается зигота либо двуклеточный проэмбрио. К 12-дню у 30 % зародышей образуются апексы побегов. Последующее развитие зародыша сопровождается многочисленными отклонениями, приводящими к недоразвитию осевых органов и его гибели.

Для данного варианта гибридизации американскими учеными J.Mc.D.Stewart, C.L.Hsu [321] и сотрудниками нашей лаборатории А.Азизходжаевым и З.Умаровым [29] разработаны методы получения гибридных растений путем культивирования *in vitro* оплодотворенных семяпочек с последующим культивированием недозрелых зародышей.

При гибридизации старосветских видов хлопчатника с новосветскими Н.С.Беляева [56] наблюдала картину, при которой одна пыльцевая трубка доходила до яйцеклетки и проникала в нее, а другая задерживалась в синергиде. Слияние женских и мужских половых ядер протекало так же, как при самоопылении. Автором также отмечено, что при участии тетраплоидного вида *G. barbadense* L. в качестве материнской формы оплодотворение происходит в 7-8 % семяпочек, а если материнской формой служит *G. herbaceum* L. - оплодотворяется 60 % семяпочек. Однако развитие эндосперма не наблюдается.

Таким образом, проанализировав литературные данные, можно сказать, что большинство цитозембриологических исследований при гибридизации тетраплоид x диплоид направлены на изучение постгамной несовместимости.

4.2. Воздействие экзогенных фитогормонов на развитие и функции клеток и тканей растений

Для селекционно-генетических исследований представляют интерес не только тетраплоидные виды хлопчатника, но и диплоидные дикие виды геномов C, D, E, отличающиеся отдельными хозяйственно-ценными признаками. При гибридизации этих диплоидов с сортами тетраплоидных видов *G. hirsutum* L. и *G. barbadense* L., в основном, изучены поведение хромосом в мейозе и причины стерильности гибридов [42, 43, 196, 251, 316, 317, 320, 336].

Особенности прохождения эмбриологических процессов между геномами C, D, E и (AD)₁, (AD)₂ изучены в недостаточной степени. Это связано с большими трудностями получения гибридных растений.

Ряд исследователей [35, 42, 50, 78, 214] считают, что нескрещиваемость видов связана с нарушениями физиологических процессов при оплодотворении, при развитии зиготы и эндосперма. Это обусловлено систематической отдаленностью видов и различной плоидностью. Возможно, что при этом нарушение физиологического функционирования двух различных геномов в одной материнской цитоплазме приводит к ранней гибели гибридного зародыша. Это может быть одной из причин несовместимости при межвидовых гибридизациях растений. Физиологические нарушения при отдаленной гибридизации, особенно в процессе оплодотворения - мало исследованная и весьма важная область, изучение которой предоставляет возможность для преодоления барьера в эмбриогенезе при отдаленной разнохромосомной гибридизации [49]. Доказательством этого может служить развитие оплодотворенных гибридных семяпочек *in vitro* в присутствии фитогормонов и витаминов на искусственной питательной среде, которые способствуют преодолению структурных аномалий во время или после оплодотворения [15, 29, 30, 321].

Известно, что фитогормоны в комплексе с белками в клетке являются рецепторами генома, ответственными за рост и развитие клеток [65, 110, 165]. Эту способность фитогормонов можно использовать для сохранения синхронизации физиологических функций генной детерминации хромосом двух генотипов при отдаленной межвидовой гибридизации растений, в частности, хлопчатника.

Воздействию экзогенных фитогормонов на рост, развитие и физиологические функции клеток и тканей посвящено огромное количество исследований. Влияние ИУК и других ауксинов на деление клеток и культивирование генеративных органов, тканей и клеток растений широко изучено. При культивировании изолированных тканей, для стимуляции каллусообразования применяются различные фитогормоны из группы ауксинов: ИУК, НУК, 2,4-Д [59, 115, 118, 200, 224, 242, 263, 274, 307, 325, 340].

Повышение концентрации ИУК в пассированной культуре до 1 мг/л часто приводит к образованию корней, а более высокие дозы вызывают гипертрофию клеточного роста и появление гигантских, не способных к делению, клеток [59]. НУК и 2,4-Д в более высоких концентрациях применяются для стимуляции каллусообразования кусочков ткани (1-2 мг/л) [59, 66, 105, 106, 180, 325].

В зависимости от видовой специфичности растительных клеток фитогормоны применяются в различных сочетаниях или в отдельности [59, 199, 200, 229, 239, 257, 262, 291].

Фитогормоны широко применяются в процессе культивирования *in vitro* незрелых гибридных зародышей для преодоления постгамной несовместимости при отдаленной межвидовой гибридизации. В большинстве случаев для индукции роста незрелых зародышей используются ИУК, ГК, БАП, зеатин и др. с разнообразным сочетанием витаминов [93, 145, 209, 312].

В большинстве исследований рост и развитие семян и зародышей *in vitro* регулируются не одним отдельным фитогормоном, а их сочетанием и зависят от соотношений ауксинов и гиббереллинов [61, 62, 219, 293, 321], ауксинов и цитокининов [65, 110], гибберелловой и феруловой кислот [70] и т.д.

Экзогенные фитогормоны успешно применяются при микроклональном размножении сельскохозяйственных растений *in vitro*. Для этого используются различные органы растений: участки побегов, меристемы, каллусные клетки, луковичи, гипокотили, зародыши, семядольные листья и др. [72, 227, 233, 235, 287, 335].

Экзогенные фитогормоны также широко используются для укоренения черенков растений [85, 123, 128].

При микроклональном размножении *in vitro* для многих культур, в основном, используются различные соотношения ауксинов и цитокининов. Например, при микроклональном размножении

шоколадного дерева [235], огурца [287], вишни [145], яблони [92], смородины [127] и др. использованы ИМК с БАП в различных концентрациях. Для отдельных культур хороший эффект дает сочетание ИУК с БАП и др. [72, 85, 123, 127, 307, 345].

Обработка регенерантов устойчивых форм ячменя растворами абсцизовой кислоты в концентрациях 0,002, 0,006, 0,01 % способствовала лучшей приживаемости стерильных растений в почве, сокращая на 1-4 дня период адаптации [195].

Из огромного количества литературы по действию экзогенных фитогормонов вытекает, что фитогормоны ускоряют рост и развитие, повышают продуктивность и в некоторых случаях иммунную способность растений. В основе всего этого лежит стимуляция физиолого-биохимических процессов под влиянием экзогенных фитогормонов, первичным механизмом которых является активация экспрессии генов и ее трансляции. Эти регуляторные способности фитогормонов очень удачно применяются в области культуры изолированных органов, клеток, протопластов, микрочеренкования и т.д.

Как упоминалось, при отдаленной межвидовой гибридизации растений, при благоприятном оплодотворении яйцеклетки несовместимость может проявляться на уровне экспрессии генов за счет слияния двух разных отдаленных генотипов. Нарушение также возможно после нескольких делений клеток зиготы в функционировании хромосом двух разных генотипов в цитоплазме одной клетки (материнской). Все это непосредственно может быть результатом, определяющим цитозмбриологическую несовместимость при гибридизации разнохромосомных видов. Учитывая, что фитогормоны являются факторами, регулирующими экспрессию генов и активацию синтеза РНК, можно попытаться использовать это свойство для преодоления несовместимости при отдаленной межвидовой гибридизации растений.

Имеются отдельные литературные источники, посвященные этим вопросам. Например, работа M.S.Gill и S.Bajaj [244], где авторы скрещивали культурные диплоидные виды хлопчатника (*G.arboreum* L., *G.herbaceum* L.) с дикорастущими диплоидными видами (*G.stoksi* Mast., *G.anomalum* Waw.). Для предотвращения опадения гибридных завязей материнские растения через 5-8 дней после опыления опрыскивали раствором НУК (100 мг/л) и ГК (50

мг/л). Через 15 дней после опыления удалось получить дифференцированные гибридные зародыши, которые культивировали *in vitro* и получили гибридные растения.

И.Д.Когут и др. [103] применением раствора препарата 2.4.5-Т (трихлор - феноксиуксусная кислота) в концентрации 0,0025-0,0035% удалось повысить выход гибридных семян картофеля при отдаленной гибридизации.

Р.И.Ковальчук [101] для преодоления нескрещиваемости при отдаленной межвидовой гибридизации хлопчатника (*G.hirsutum* L. x *G.arboreum* L., *G.hirsutum* L. x *G.herbaceum* L.) кастрированные цветки перед опылением обрабатывала фитогормонами (2,4-Д, ИУК, ГК). При этом оказалось, что у обработанных растений проросших пыльцевых трубок в столбике было вдвое больше. В отдельных случаях обработки автору удалось получить 1-2 нормальных гибридных семени.

D.W.Altman [207] для регуляции эмбриогенеза при межвидовой гибридизации хлопчатника, воздействуя экзогенными фитогормонами, изучал широкий спектр изменений между *G.hirsutum* L. и шестью диплоидными дикорастущими видами. При этом он показал, что обработкой экзогенными фитогормонами можно регулировать развитие зародыша до дифференциации. Однако экзогенные фитогормоны не вызывали нормального развития эндосперма, вследствие чего не удавалось получить зрелые семена.

Таким образом, экзогенные фитогормоны можно использовать также и в регуляции развития зародыша при отдаленной межвидовой гибридизации растений.

Исходя из этого, мы поставили перед собой цель — разработать метод преодоления межвидовой несовместимости хлопчатника действием экзогенных фитогормонов.

Для этого изучали особенности влияния экзогенных фитогормонов на нескрещиваемость, опадение завязей и развитие гибридных семян в комбинациях *G.hirsutum* L. x *G.raimondii* Ulbr., *G.hirsutum* L. x *G.thurberi* Tod., *G.hirsutum* L. x *G.anomalum* Waw., *G.hirsutum* L. x *G.sturtii* F. Müell.; подбирали фитогормоны и их концентрации, способствующие эффективному преодолению нескрещиваемости при данных вариантах гибридизации.

Указанные дикорастущие диплоидные виды использовались как доноры присущих им полезных признаков, которые желательно

перенести в гибриды. Мы сочли необходимым дать краткую характеристику выбранным видам:

Вид *G.raimondii* Ulbr. (2n=26)

Многолетний кустарник высотой 2-3 м, все органы сильно опушены. Плодовые ветви членистые, облиственные. Листья цельнокрайние, сердцевидные, с заостренным концом, крупные, обычно в длину 15 см и более. Цветки крупные, антоциановое пятно достигает половины лепестка. Рыльце очень длинное. Коробочка — 3-5-створчатая, заостренная. В каждой створке — 4-8 семян. Семена свободные, покрыты густым зеленоватым волокном длиной 10 мм. Распространен в Северном Перу. Растение ксеро-мезофитное, отличается высоким качеством волокна, слабо поражается вилтом, устойчиво к засухе, колюще-сосущим вредителям [124, 177].

Вид *G.thurberi* Tod. (2n=26)

Многолетний кустарник высотой от 1 до 3 м, с многочисленными ветвями, листья и ветви без опушения. Поверхность коробочки опушена. Листья с ланцетовидными долями, долек обычно 3-7. Прицветники маленькие. Цветы мелкие, раскрываются широко. В основании лепестков имеется небольшое антоциановое пятно. Коробочки — 3-4-створчатые, мелкие. В каждой створке обычно имеется по 6 семян, покрытых шелковистым волокном. Семена каменистые. Растение переносит кратковременные заморозки до -7 -10° С, вид сильно реагирует на длину дня, т.е. он фотопериодичный. Устойчив ко всем коробочным червям. Распространен в Аризоне (США), на Юго-Западе Чиуада (Мексика) [10, 124, 177].

Вид *G.anomalum* Waw. (2n=26)

Многолетний кустарник высотой 1-2 м. Стебли тонкие, слабые. Все органы растений покрыты длинными, мягкими волосками. Листья — 3-5-лопастные, глубоко рассеченные и суженные у основания. Коробочка — 3-створчатая, с острыми концами, в каждой створке — по 4-6 семян. Семена длинные и тонкие, покрыты шелковистым коричневым волокном длиной 10 мм. Вид обладает высоким качеством волокна и сильно опушенным листом, что делает его устойчивым к сосущим вредителям, также устойчив к гоммозу, засухе, сухой жаре и т.д., слабо фотопериодичный. Распространен в Юго-Западной Африке, Анголе, Судане, Эритреи, Сомали [124, 177].

Вид *G.sturtii* F. Müell. (2n=26)

Многолетний кустарник, достигающий высоты 3м, с многочисленными ветвями с антоциановой окраской. Вегетативные органы без опушения, но с железками. Листья имеют сердцевидную форму. Почти цельнокрайние. Лепестки цветка розовато-лиловые, в основании лепестков имеется темно-красное пятно. Рыльце цветка длинное. Коробочка — 4-5-створчатая, покрыта черными железками. В каждой створке — по 4-6 семян с зеленым подпушком. Растение переносит кратковременные заморозки, чрезвычайно высокоустойчиво к гоммозу, вертициллезному вилту и насекомым. Слабо фотопериодичен. Распространен в Центральной и Южной Австралии [124, 177].

Сорта вида *G.hirsutum* L. (2n=52)

Сорта 108-Ф, С-4727, С-6524 районированы на больших площадях в хлопкосеющих зонах страны. Растения однолетние, 108-Ф и С-4727 с V типом волокна, С-6524 — с IV типом. По морфологическим признакам данные сорта похожи друг на друга: куст сжатый, узкопирамидальной формы, среднеоблиствен, 100-115 см высоты. Стебель прямой, слабоопушенный, зеленый. Плодовые ветви полуторного типа, высота закладки первого симподия на 5-6 узле. Цветок средний, лепестки и пыльца светло-кремового цвета. Листья средней величины, 3-5-лопастные. Коробочки крупные, 6-7 г у С-4727, 108-Ф и на 1-1,5 г меньше у С-6524. Скороспелость от всхода до 50% созревания у С-4727 115-120 дней, у 108-Ф — 130-136 дней, у С-6524 — 120-125 дней [13, 170].

Скрещивания проводили по общепринятой в селекции методике.

4.3. Сохранение завязей в зависимости от возраста в период обработки фитогормонами

Для установления эффективно действующей дозы регуляторов роста, в первую очередь, необходимо выявить подходящий возраст исследуемого объекта, отчего будет зависеть успех эксперимента.

Наиболее оптимальный для обработки возраст определяли по действию фитогормонов на 1-, 2-, 3-суточные после опыления завязи. Эксперимент проводился при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.anomalum* Waw.

Фитогормоны (ИУК, кинетин, гибберелловая кислота) испытывались в двух концентрациях — 50 и 100 мг/л. Для этого через 1, 2, 3 суток после опыления поверхность завязей обрабатывали 2-3 каплями раствора фитогормона, отмечая при этом на этикетке вариант и дату обработки. В качестве контроля служили завязи, обработанные дистиллированной водой. После созревания коробочек (через 2 месяца в полевых условиях и через 40-50 дней в теплице) проводился учет количества сохранившихся коробочек и коробочек с семенами.

Проведенные исследования показали, что среди изученных трех фитогормонов наиболее эффективное действие на сохранение скрещенных коробочек и формирование гибридных семян оказали гибберелловая кислота и кинетин (табл.1).

Однодневные завязи трудно поддаются обработке, так как пленка, сохраняющаяся после удаления тычиночной колонки на поверхности завязи, мешает работе. В этом возрасте удаление пленки приводит к механическому повреждению поверхности завязи. Несмотря на это, обработкой 1-дневных завязей гиббереллином удается сохранить 9-13 % коробочек, кинетином — 16-17 % (см. табл. 1).

На второй день после опыления как в условиях теплицы, так и на открытом грунте пленка на поверхности завязи высыхает, трескается и легко отделяется. Поэтому в данном возрасте очень удобно обрабатывать поверхность завязи раствором фитогормонов. Данные экспериментов показали, что именно в этом возрасте наблюдается наибольшая завязываемость плодозлементов (см. табл. 1).

Скрещенные завязи, обработанные на третьи сутки после опыления, в большинстве случаев опадают, а сохранившиеся значительно отстают в развитии по сравнению с завязями самоопыленных растений. В таких коробочках формируется всего по 1-2 семени (см. табл.1). Как установлено, при обработке ИУК сохранялось определенное количество коробочек, но в них не развивались семена.

Таким образом, проведенные исследования показали, что наиболее эффективное действие фитогормонов при отдаленной межвидовой гибридизации проявляется при обработке завязей на вторые сутки после опыления. Возможно, это связано с физиологическим состоянием завязи и семяпочек в этом возрасте, совпадающем с периодом оплодотворения.

Таблица 1

Влияние экзогенных фитогормонов на сохранение и формирование семян при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.anomalum* Waw.

Возраст завязей, дни после опыления	Количество		
	скрещенных завязей, шт.	сохранившихся коробочек, %	коробочек с семенами, %
Контроль — H ₂ O			
1	91	-	-
2	84	-	-
3	93	-	-
Гибберелловая кислота 50 мг/л			
1	74	13	7
2	83	52	29
3	90	7	1
Гибберелловая кислота 100 мг/л			
1	89	9	2
2	88	61	38
3	96	4	1
Кинетин 50 мг/л			
1	91	17	3
2	86	31	17
3	94	6	2
Кинетин 100 мг/л			
1	80	16	10
2	8	26	17
3	74	4	0
β-индолилуксусная кислота 50 мг/л			
1	76	6	-
2	89	21	-
3	84	3	-
β-индолилуксусная кислота 100 мг/л			
1	101	7	-
2	94	24	-
3	97	2	-

На основании полученных результатов дальнейшие исследования по влиянию экзогенных фитогормонов при отдаленной межвидовой гибридизации проводились на 2-дневных завязях. Они были направлены на изучение влияния экзогенных фитогормонов на формирование семян хлопчатника в комбинациях скрещиваний между *G.hirsutum* L. и диплоидными видами *G.raimondii* Ulbr.,

G.thurberi Tod., *G.anomalum* Waw., *G.sturtii* F.Muell. с целью выявления наиболее оптимальных концентраций.

Из фитогормонов испытывались ИУК, 2,4-Д, НУК, ГК, БАП, кинетин в концентрациях 10, 20, 40, 60, 80, 100 мг/л и смеси фитогормонов ИУК+ГК (60+80 мг/л, 80+80 мг/л, 100+80 мг/л), НУК+ГК (60+80 мг/л, 80+80 мг/л, 100+80 мг/л) и ИУК + кинетин (60+50 мг/л, 80+50 мг/л, 100+50 мг/л).

4.4. Влияние экзогенных фитогормонов на формирование семян при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.raimondii* Ulbr.

Действие экзогенных фитогормонов на сохранение коробочек при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.raimondii* Ulbr. изучалось в условиях теплицы в осенне-весенний период. Температура воздуха при этом поддерживалась на уровне +25° +32°C.

Экзогенная ИУК эффективно влияла на сохранение коробочек и формирование семян при данном скрещивании. При обработке ИУК в низкой концентрации (10, 20 мг/л) сохранилось 11-20% коробочек (табл. 2). При этом всего в 2-4% коробочек формируется по 1-2 гибридного семени. По мере повышения концентрации ИУК увеличивается процент завязываемости. Так, при концентрации 60 мг/л сохраняется 70% обработанных коробочек, многие из которых содержат от 1 до 6 семян (в среднем 3,5 семян в коробочке). Данная концентрация ИУК оказалась наиболее оптимальной для сохранения коробочек при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.raimondii* Ulbr. При дальнейшем повышении концентрации ИУК наблюдается резкое уменьшение количества сохранившихся коробочек и сформированных в них семян.

Обработка 2-дневных после опыления завязей раствором 2,4-Д различной концентрации не способствует сохранению гибридных коробочек при скрещивании *G.hirsutum* L. с *G.raimondii* Ulbr.

Растворы α-нафтилуксусной кислоты в низких концентрациях при данной гибридизации также не оказали положительного действия на завязываемость коробочек. Лишь более высокие концентрации НУК (60, 80, 100 мг/л) способствовали сохранению 8-10 % обработанных завязей. Однако, как показали анализы, несмотря на нормальный вид коробочек, в них не наблюдалось присутствие семян. Обработка данным фитогормоном, вероятно, стимулирует

рост лишь соматических тканей пестика, не влияя, при этом, на эмбриональные процессы.

Таблица 2

Влияние ИУК на завязываемость и формирование семян при гибридизации *G.hirsutum L. x G.raimondii Ulbr.*

Концентрация растворов, мг/л	Количество			Предел колебаний количества семян в коробочке, шт.	Среднее количество семян в коробочке, шт.
	обработанных завязей, шт.	сохранившихся коробочек, %	коробочек с семенами, %		
Контроль	96	-	-	-	-
10	83	11	2	1	1,0
20	83	20	4	1-2	1,8
40	82	27	9	1-2	1,5
60	84	70	67	1-6	3,3
80	85	34	16	1-5	2,8
100	84	26	4	1-2	1,2
НСР ₀₁ 0,93					

Наиболее эффективно из фитогормонов на сохранение гибридных коробочек и формирование семян при скрещивании *G.hirsutum L. x G.raimondii Ulbr.* действовала гибберелловая кислота (табл.3). Как установлено, при обработке 60-80 мг/л ГК удалось сохранить около 67-85 % завязей, в которых было сформировано по 1-6 семян. Полученные семена полноценные, имели очень высокую всхожесть, при прорастании аномальных явлений не отмечалось.

Изучение двух представителей группы цитокининов показало, что они оказывали различное влияние на преодоление нескрещиваемости при гибридизации *G.hirsutum L. x G.raimondii Ulbr.* Так, применение 6-бензиламинопурина более высоких концентраций (60, 80, 100 мг/л), хотя и способствовало сохранению 30-40 % скрещенных коробочек, но не влияло на регуляцию процесса формирования зародыша и эндосперма, вследствие чего все сохранившиеся коробочки не имели семян.

Влияние же кинетина на сохранение коробочек при рассматриваемой гибридизации (табл. 4) было почти таким же, как ИУК и ГК, но пределы колебаний сформированных семян и среднее количество семян в коробочке в данном варианте оказались значитель-

но выше. Как видно из табл. 4, при всех изученных концентрациях кинетина способствовал сохранению коробочек.

Таблица 3

Влияние гибберелловой кислоты на завязываемость и формирование семян при гибридизации *G.hirsutum L. x G.raimondii Ulbr.*

Концентрация растворов, мг/л	Количество			Предел колебаний количества семян в коробочке, шт.	Среднее количество семян в коробочке, шт.
	обработанных завязей, шт.	сохранившихся коробочек, %	коробочек с семенами, %		
Контроль	76	-	-	-	-
10	74	18	5	1-3	2,1
20	73	21	7	1-2	1,5
40	75	39	29	1-4	2,1
60	73	67	55	1-6	1,9
80	75	85	65	1-4	1,7
100	74	28	8	1-3	2,3
НСР ₀₁ 0,76					

Таблица 4

Влияние кинетина на завязываемость и формирование семян при гибридизации *G.hirsutum L. x G.raimondii Ulbr.*

Концентрация растворов, мг/л	Количество			Предел колебаний количества семян в коробочке, шт.	Среднее количество семян в коробочке, шт.
	обработанных завязей, шт.	сохранившихся коробочек, %	коробочек с семенами, %		
Контроль	75	-	-	-	-
10	74	24	5	3-5	3,1
20	75	28	16	2-5	2,2
40	75	60	31	2-10	5,6
60	75	55	44	3-8	5,5
80	76	44	17	2-8	4,9
100	76	12	8	1-3	1,6
НСР ₀₁ 1,17					

Самыми эффективными концентрациями были 40 и 60 мг/л, где

в одной коробочке сформировалось от 2 до 10 семян, в среднем – 5,5-5,6 шт.

Далее проводили исследования по влиянию различных смесей фитогормонов на преодоление нескрещиваемости при гибридизации *G.hirsutum L. x G.raimondii Ulbr.*

Результаты экспериментов приведены в табл. 5. Из данных видно, что сочетание ИУК с ГК способствует формированию большего числа гибридных семян, нежели при применении гормонов в отдельности. Здесь необходимо отметить, что наиболее эффективное влияние на формирование гибридных семян оказала смесь фитогормонов повышенных концентраций (ИУК – 100 мг/л + ГК – 80 мг/л).

Таблица 5

Влияние смесей фитогормонов на завязываемость и формирование семян при гибридизации *G.hirsutum L. x G.raimondii Ulbr.*

Концентрация растворов, мг/л	Количество			Предел колебаний количества семян в коробочке, шт.	Среднее количество семян в коробочке, шт.
	обработанных завязей, шт.	сохранившихся коробочек, %	коробочек с семенами, %		
Смесь ИУК + ГК					
Контроль	152	-	-	-	-
60+80	111	81	47	1-5	2,4
80+80	97	72	43	1-8	4,9
100+80	113	89	59	2-10	4,8
					НСР ₀₁ 1,94
Смесь ИУК + ГК					
Контроль	100	-	-	-	-
60+80	91	52	22	1-3	1,4
80+80	90	57	28	1-4	2,4
100+80	90	41	14	1-3	2,4
					НСР ₀₁ 1,19
Смесь ИУК + кинетин					
Контроль	100	-	-	-	-
60+50	87	61	21	2-4	3,3
80+50	93	59	25	2-4	2,9
100+50	90	67	27	2-5	3,2
					НСР ₀₁ 1,95

При совместном применении ИУК с ГК наблюдался более низкий процент завязываемости (см. табл. 5) и это, вероятно, связано с особенностями действия ИУК, которая при отдельном применении также не давала положительного эффекта.

Действием смеси ИУК с кинетином удается сохранить большую часть скрещенных коробочек (см. табл. 5). Однако на формирование семян данная смесь оказывает меньший эффект, чем ИУК и кинетин в отдельности.

Таким образом, в комбинации скрещивания *G.hirsutum L. x G.raimondii Ulbr.* среди всех изученных фитогормонов и их смесей самой эффективной по влиянию на завязываемость оказалась смесь фитогормонов в высоких концентрациях (ИУК 100 мг/л + ГК 80 мг/л), с помощью которой удалось сохранить 89% плодоеlementов, среди которых 59% были с семенами по 4,8 шт. в коробочке, а по влиянию на количество семян в коробочке (5,6 шт/1 кор.) оптимальным был раствор кинетина в концентрации 40 мг/л.

4.5. Влияние экзогенных фитогормонов на формирование семян при гибридизации *G.hirsutum L. x G.thurberi Tod.*

Исследования по изучению влияния экзогенных фитогормонов на формирование семян в комбинации скрещивания *G.hirsutum L. x G.thurberi Tod.* проводились в летний сезон на открытом грунте в течение двух лет. Хотя вид *G.thurberi Tod.* по происхождению и геномной группе (Д) относительно близок к *G.raimondii Ulbr.*, все же скрещиваемость их с сортами *G.hirsutum L.* различна. При гибридизации *G.hirsutum L. x G.thurberi Tod.* без обработки фитогормонами все завязи опадают, т.е. не удается сохранить скрещенные коробочки. Обработка же 2-дневных завязей способствует их сохранению и при этом формируется некоторое количество семян. Однако эти показатели значительно ниже, чем при гибридизации *G.hirsutum L. x G.raimondii Ulbr.* Возможно, это связано с прорастанием ограниченного количества пыльцы в чужеродной ткани пестика и с различиями в биохимизме пыльцы и рыльца различных видов.

Результаты исследований показали, что при гибридизации *G.hirsutum L. x G.thurberi Tod.* из группы рассмотренных нами ауксинов на сохранение завязей и формирование в них семян

эффективнее действует ИУК. При обработке 2-суточных после опыления завязей ИУК, даже в низких концентрациях, способствует сохранению коробочек. При этом эффективность действия стимулятора в пределах 25%. Дальнейшее повышение концентрации ИУК в растворе незначительно изменило уровень сохранения скрещенных коробочек. Только в 4-7% сохранившихся коробочек развивались гибридные семена, число которых не превышало 1-2 штук. Гибридные семена формируются в основном в нижней части коробочки, верхние высыхают. Большая часть полученных семян полноценная. Повышение концентрации ИУК до 100 мг/л не приводит к существенному изменению результатов по преодолению нескрещиваемости при данном варианте гибридизации (табл. 6).

Таблица 6

Влияние β -индолилуксусной кислоты на завязываемость и формирование семян при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.thurberi* Tod.

Концентрация растворов, мг/л	Количество			Предел колебаний количества семян в коробочке, шт.	Среднее количество семян в коробочке, шт.
	обработанных завязей, шт.	сохранившихся коробочек, %	коробочек с семенами, %		
Первый год исследований					
Контроль	78	-	-	-	-
10	80	25	6	1	1,0
20	81	37	4	1-2	1,1
40	80	28	7	1	1,0
60	84	28	6	1	1,0
80	81	28	6	1-2	1,4
100	80	25	3	1-2	1,1
НСР ₀₁ 0,39					
Второй год исследований					
Контроль	50	-	-	-	-
10	41	31	7	1-2	1,3
20	41	43	5	1-2	1,6
40	40	38	4	1-2	1,1
60	40	49	10	1-3	2,4
80	41	63	17	1-3	1,4
100	41	56	12	1-3	1,4
НСР ₀₁ 0,55					

Действие ИУК на формирование семян при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.thurberi* Tod. было повторно исследовано на второй год. Полученные результаты, в основном, повторили итоги предыдущего года. Здесь наблюдалось незначительное увеличение показателей завязываемости. Эти исследования дали возможность определить оптимальную дозу раствора ИУК (60 и 80 мг/л) для преодоления нескрещиваемости в данной комбинации.

Дальнейшее изучение экзогенных фитогормонов (НУК, 2,4-Д) показало, что НУК во всех концентрациях способствует сохранению завязей после скрещивания, но не способна регулировать формирование гибридных семян. Все сохранившиеся коробочки оказались пустыми. При исследованиях на второй год также не наблюдалось образования гибридных семян.

Результаты исследований влияния растворов 2,4-Д на сохранение плодоземелентов в данной комбинации скрещивания были схожими с результатами, полученными при изучении действия НУК. Показатель завязываемости, в зависимости от концентрации 2,4-Д колебался от 11-14 % в первый год исследований до 10-14% во второй год. Двухгодичные исследования показали, что 2,4-Д не влияет на формирование гибридных семян при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.thurberi* Tod.

Растворы гибберелловой кислоты при рассматриваемой комбинации скрещивания способствуют формированию семян лишь в концентрациях от 40 мг/л до 80 мг/л (табл. 7). Другие концентрации ГК, хотя и способствуют сохранению завязей, не регулируют формирование семян. Самое эффективное положительное влияние отмечено при использовании ГК в концентрации 60 мг/л. В этих опытах сохранялось до 47% коробочек, в 19% из них образовались семена. Количество их в коробочке составило в среднем 1,8 шт. Повторное изучение дало аналогичные результаты.

На регуляцию формирования семян при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.thurberi* Tod. оказывают влияние фитогормоны из группы цитокининов в определенных концентрациях. Кинетин в более низких концентрациях (10-40 мг/л) благоприятно влияет на преодоление нескрещиваемости, способствуя нормальному делению зиготы и эндосперма (табл. 8). Так, при обработке 40 мг/л раствором кинетина удается сохранить до 33 % скрещенных завязей, в 14 % из которых формируются семена. Такая концентрация кинетина

является оптимальной для формирования семян при данной комбинации гибридизации хлопчатника.

Таблица 7

Влияние гибберелловой кислоты на завязываемость и формирование семян при гибридизации *G.hirsutum L. x G.thurberi Tod.*

Концентрация растворов, мг/л	Количество			Предел колебаний количества семян в коробочке, шт.	Среднее количество семян в коробочке, шт.
	обработанных завязей, шт.	сохранившихся коробочек, %	коробочек с семенами, %		
Первый год исследований					
Контроль	76	-	-	-	-
10	80	21	-	-	-
20	80	19	-	-	-
40	78	36	6	1-2	1,4
60	78	47	19	1-3	1,8
80	78	42	19	1-2	1,2
100	78	24	-	-	-
НСР ₀₁ 0,51					
Второй год исследований					
Контроль	53	-	-	-	-
10	45	16	-	-	-
20	47	4	-	-	-
40	45	33	9	1-2	1,2
60	44	61	18	1-3	1,5
80	46	36	16	1-2	1,3
100	46	18	2	1	1,0
НСР ₀₁ 0,60					

Изучение влияния БАП, относящегося также к цитокининам, на образование гибридных семян в течение двух лет не дало положительных результатов, хотя данный регулятор роста способствует сохранению определенного количества скрещенных завязей. Возможно, БАП способствует усилению физиолого-биохимических процессов, связанных с питанием завязей, вследствие чего на материнских растениях развиваются партенокарпические коробочки.

При исследовании влияния различных смесей фитогормонов нами получены интересные данные. Смесью ИУК (100 мг/л) и ГК (80 мг/л) очень эффективно способствовала преодолению нескрещи-

ваемости хлопчатника при гибридизации *G.hirsutum L. x G.thurberi Tod.* При этом удалось сохранить до 59 % скрещенных завязей, из них в 20 % образовались семена (табл.9). Эти же фитогормоны, но взятые в отдельности, показывали наиболее эффективное действие при использовании их в низких концентрациях (см. табл.6, 7).

Таблица 8

Влияние кинетина на завязываемость и формирование семян при гибридизации *G.hirsutum L. x G.thurberi Tod.*

Концентрация растворов, мг/л	Количество			Предел колебаний количества семян в коробочке, шт	Среднее количество семян в коробочке, шт.
	обработанных завязей, шт.	сохранившихся коробочек, %	коробочек с семенами, %		
Первый год исследований					
Контроль	75	-	-	-	-
10	80	28	4	1	1,0
20	79	28	3	1-2	1,5
40	80	33	14	1-2	1,5
60	81	21	-	-	-
80	80	19	-	-	-
100	82	19	-	-	-
НСР ₀₁ 0,28					
Второй год исследований					
Контроль	42	-	-	-	-
10	41	66	7	1-2	1,3
20	42	45	2	1	1,0
40	42	52	14	1-3	1,9
60	41	15	-	-	-
80	41	24	-	-	-
100	41	22	-	-	-
НСР ₀₁ 0,48					

Смеси фитогормонов НУК с ГК оказывали положительное влияние только на сохранение скрещенных завязей, но не на завязываемость семян (табл.9), хотя ГК, примененная в отдельности, в концентрации 80 мг/л способствовала формированию гибридных зародышей. Однако в составе смеси фитогормонов ГК такого влияния не оказывает. Возможно, это связано с тем, что два фитогормона, действуя по-разному на разные физиолого-биохимические процессы, вызывают диспропорциональное развитие гибридного зародыша и эндосперма, либо НУК ингибирует действие ГК.

Таблица 9

Влияние смесей фитогормонов на завязываемость и формирование семян при гибридизации *G.hirsutum L. x G.thurberi Tod.*

Концентрация растворов, мг/л	Количество			Предел колебаний количества семян в коробочке, шт.	Среднее количество семян в коробочке, шт.
	обработанных завязей, шт.	сохранившихся коробочек, %	коробочек с семенами, %		
Смесь ИУК + ГК					
Первый год исследований					
Контроль	79	-	-	-	-
60+80	80	36	9	1-2	1,8
80+80	80	31	13	1-2	1,8
100+80	80	59	20	1-3	1,9
					НСР ₀₁ 0,49
Второй год исследований					
Контроль	40	-	-	-	-
60+80	43	42	7	1	1,0
80+80	43	26	2	1	1,0
100+80	42	74	14	1-3	2,4
					НСР ₀₁ 0,53
Смесь ИУК + ГК					
Первый год исследований					
Контроль	82	-	-	-	-
60+80	80	25	-	-	-
80+80	83	21	-	-	-
100+80	81	26	-	-	-
Второй год исследований					
Контроль	42	-	-	-	-
60+80	43	28	-	-	-
80+80	43	28	-	-	-
100+80	42	24	-	-	-
Смесь ИУК + кинетин					
Первый год исследований					
Контроль	84	-	-	-	-
60+50	80	24	-	-	-
80+50	80	26	-	-	-
100+50	80	20	-	-	-
Второй год исследований					
Контроль	60	-	-	-	-
60+50	63	22	-	-	-
80+50	63	32	-	-	-
100+50	61	36	-	-	-

Такое же действие на сохранение завязей и образование семян при гибридизации *G.hirsutum L. x G.thurberi Tod.* наблюдается при применении смеси ИУК с кинетином (см. табл. 9). Несмотря на то, что в отдельности ИУК и кинетин способствовали образованию гибридных семян, при совместном их использовании они не проявили эту способность. Возможно, это вызвано тем, что в примененной смеси раствор кинетина был в концентрации 50 мг/л, тогда как действующая концентрация кинетина равнялась 40 мг/л. Или, как упоминалось, возможно, фитогормоны в смеси ингибируют действие друг друга или вызывают диспропорциональное развитие зародыша именно при данной комбинации скрещивания (*G.hirsutum L. x G.thurberi Tod.*).

Таким образом, самыми оптимальными факторами воздействия для сохранения плодоземелентов и формирования семян при гибридизации *G.hirsutum L. x G.thurberi Tod.* оказались ГК в концентрации 60 мг/л (61%) и смесь ИУК (100 мг/л) с ГК (80 мг/л) (74%).

Все полученные гибридные семена полноценные, имеют хорошую всхожесть, при прорастании не наблюдается каких-либо аномалий. На рис. 3-8 показано развитие семязпочек при гибридизации *G.hirsutum L. x G.thurberi Tod.* без и с обработкой экзогенными фитогормонами.

При данной гибридизации наблюдаются отклонения в развитии семязпочек (см. рис. 3-5). Так, начиная с 3 дня после опыления (см. рис. 4), видно отставание в развитии семязпочек и, естественно, завязей, по сравнению с самоопыленными сортами. 6-дневные после опыления завязи *G.hirsutum L. x G.thurberi Tod.* по развитию соответствуют 3-дневным завязям сорта С-6524 (см. рис. 5). На 6-й день после опыления гибридные завязи начинают высыхать и постепенно опадают. При рассматриваемой комбинации скрещивания уже на 4-5-й день после опыления можно наблюдать достаточно высокий процент опадения завязей. Завязи, вскрытые на следующий день после обработки смесью фитогормонов ИУК (100 мг/л) с ГК (80 мг/л), содержали нормально развитые семязпочки (см. рис. 6). Однако при этом наблюдается сужение верхней части большинства завязей. На пятый день после опыления, т.е. на третий после обработки, верхние семязпочки становятся сморщенными и прекращают рост (см. рис. 7). В данном варианте гибридизации после обработки экзогенными фитогормонами, в основном, развиваются семязпочки, расположенные ближе к основанию завязи.

В дальнейшем эти семязпочки нормально развиваются до созревания. На рис. 8 хорошо видны нормально развитые семязпочки, образующие волокно, и свободные места неоплодотворенных семязпочек. В связи с тем, что в результате обработки ткани завязи растут интенсивно, коробочки приобретают достаточно крупные размеры. Но, так как семян мало, они менее плотные, чем коробочки, полученные при самоопылении.

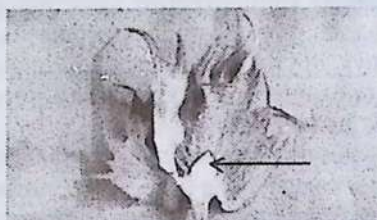


Рис. 3. Развитие 2-дневных семязпочек при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.thurberi* Tod. без обработки экзогенными фитогормонами (контроль)



Рис. 4. Развитие 3-дневных семязпочек при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.thurberi* Tod. без обработки экзогенными фитогормонами (контроль)



Рис. 5. Развитие 6-дневных семязпочек при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.thurberi* Tod. без обработки экзогенными фитогормонами (контроль)



Рис. 6. Развитие 3-дневных семязпочек при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.thurberi* Tod., обработанных экзогенными фитогормонами

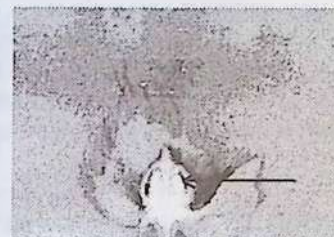


Рис. 7. Развитие 5-дневных семязпочек при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.thurberi* Tod., обработанных экзогенными фитогормонами

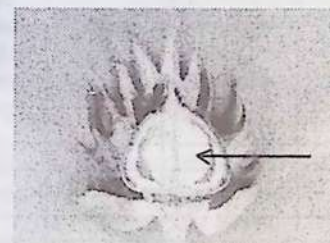


Рис. 8. Развитие 10-дневных семязпочек при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.thurberi* Tod., обработанных экзогенными фитогормонами

4.6. Влияние экзогенных фитогормонов на формирование семян при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.anomalum* Waw.

Дикорастущий вид *G.anomalum* Waw. в условиях теплицы цветет фактически круглый год. Действие экзогенных фитогормонов на формирование семян при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.anomalum* Waw. изучали в теплице в осенне-весенний периоды.

В данной комбинации скрещивания обработка 2-дневных завязей

зей после опыления экзогенными фитогормонами показала, что ауксины ИУК и 2,4-Д не влияют на развитие гибридного проэмбрио и эндосперма. Лишь при обработке растворами ИУК в концентрациях 60 и 80 мг/л удается сохранить 9-18 % скрещенных коробочек, но при этом не наблюдается образования семян. Обработка завязей растворами 2,4-Д, как и в предыдущих вариантах гибридизации, положительного эффекта не показала.

В варианте же использования НУК отмечалось сохранение большего количества скрещенных коробочек (табл. 10). Так, при наиболее оптимальном варианте 60 мг/л НУК сохранилось до 30 % коробочек, из них 7% коробочек с семенами, в среднем по 2,8 штук в каждой. При обработке 2-дневных завязей раствором с высокой концентрацией НУК (100 мг/л) определенный процент коробочек сохранился, но семян в них не образовывалось.

Таблица 10

Влияние α -нафтилуксусной кислоты на завязываемость и формирование семян при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.anomalum* Waw.

Концентрация растворов, мг/л	Количество			Предел колебаний количества семян в коробочке, шт.	Среднее количество семян в коробочке, шт.
	обработанных завязей, шт.	сохранившихся коробочек, %	коробочек с семенами, %		
Контроль	84	-	-	-	-
10	86	-	-	-	-
20	81	4	-	-	-
40	83	16	-	-	-
60	82	30	7	2-4	2,8
80	83	24	1	-	-
100	82	11	-	-	-

Среди экзогенных фитогормонов более эффективным влиянием на формирование семян при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.anomalum* Waw. отличается кинетин (табл. 11). Наилучшие результаты получены при использовании раствора кинетина в концентрациях 40-60 мг/л. Обработкой 2-дневных завязей кинетином в концентрации 60 мг/л удается сохранить максимум скрещенных коробочек (33%). Применение кинетина в данной концентрации способствует наибольшему образованию семян. При concentra-

ции 100 мг/л наблюдается уменьшение процента сохранившихся коробочек с семенами (см. табл. 11).

БАП, относящийся к группе цитокининов, в концентрации 80 мг/л способствует сохранению довольно большого числа скрещенных завязей (34%). Однако данное соединение, хотя и является стимулятором роста, на эмбриогенез не влияет, о чем свидетельствует то, что в сохранившихся коробочках не наблюдается формирования гибридных семян.

Таблица 11

Влияние кинетина на завязываемость и формирование семян при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.anomalum* Waw.

Концентрация растворов, мг/л	Количество			Предел колебаний количества семян в коробочке, шт.	Среднее количество семян в коробочке, шт.
	обработанных завязей, шт.	сохранившихся коробочек, %	коробочек с семенами, %		
Контроль	74	-	-	-	-
10	76	4	-	-	-
20	76	8	-	-	-
40	76	28	14	2-5	3,4
60	79	33	14	2-6	4,0
80	77	25	-	-	-
100	77	18	3	1-4	3,4
					НСР ₀₁ 0,51

Таблица 12

Влияние гибберелловой кислоты на завязываемость и формирование семян при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.anomalum* Waw.

Концентрация растворов, мг/л	Количество			Предел колебаний количества семян в коробочке, шт.	Среднее количество семян в коробочке, шт.
	обработанных завязей, шт.	сохранившихся коробочек, %	коробочек с семенами, %		
Контроль	94	-	-	-	-
10	96	20	14	1-6	3,6
20	96	38	28	3-10	3,9
40	96	43	39	3-12	5,8
60	97	55	52	4-14	7,1
80	97	74	62	6-14	9,4
100	96	55	51	4-9	5,7
					НСР ₀₁ 1,47

Применение растворов гибберелловой кислоты оказало очень существенное влияние на формирование гибридных семян в данной комбинации скрещивания (табл. 12). Обработка ГК, начиная с концентрации 10 мг/л, способствует образованию в одной коробочке от 1 до 6 семян. По мере возрастания концентрации ГК пропорционально повышается процент сохранившихся коробочек, а также количества семян в них. В отдельных случаях (60 и 80 мг/л) в одной коробочке насчитывалось до 14 штук гибридных семян. Самой эффективной концентрацией ГК явилась 80 мг/л. При этом сохранилось до 74% скрещенных коробочек, из которых в 62% образовалось в среднем 9,4 семян в каждой. Дальнейшее повышение концентрации ГК до 100 мг/л дало более низкие результаты.

При применении ГК совместно с ИУК также удалось сохранить до 78% скрещенных коробочек (табл. 13). При этом 51% составили коробочки с наличием семян. Как видно из результатов исследований, при совместном использовании ГК и ИУК уменьшается количество сформированных семян в коробочке. Интересным является тот факт, что при использовании смеси, где концентрация ГК остается постоянной (80 мг/л), а концентрация ИУК меняется (60, 80, 100 мг/л), влияние их на сохранение скрещенных коробочек и формирование семян различно, тогда как ИУК, применяемая в отдельности, не влияла на регуляцию семяобразования в комбинации *G.hirsutum L. x G.anomalum Waw.*

Дальнейшие исследования ГК в смеси с НУК показали, что при таком сочетании фитогормонов эффект влияния ГК на формирование семян ухудшается по сравнению со смесью ГК и ИУК (см. табл. 13). Здесь необходимо отметить, что лучший вариант завязываемости коробочек с гибридными семенами отмечен при обработке смесью с концентрацией 80+80 мг/л. Эта же концентрация смеси эффективна и при сочетании ИУК + ГК. Как видно из приведенных данных влияние смеси ИУК с кинетином по показателям количества сохранившихся коробочек с семенами, среднего количества семян на одну коробочку значительно уступает влиянию смесей ИУК + ГК и НУК + ГК (см. табл.13).

Проведенный анализ полученных результатов по влиянию экзогенных фитогормонов на сохранение плодоеlementов и образова-

ние семян при гибридизации *G.hirsutum L. x G.anomalum Waw.* показал, что из всех испытуемых фитогормонов самой эффективной оказалась обработка 2-дневных завязей раствором гибберелловой кислоты при концентрации 80 мг/л. При этом сохраняется 74% скрещенных коробочек, из которых в 62% развивается в среднем по 9,4 семян в коробочке.

Таблица 13

Влияние смесей фитогормонов на завязываемость и формирование семян при гибридизации *G.hirsutum L. x G.anomalum Waw.*

Концентрация растворов, мг/л	Количество			Предел колебаний количества семян в коробочке, шт.	Среднее количество семян в коробочке, шт.
	обработанных завязей, шт.	сохранившихся коробочек, %	коробочек с семенами, %		
Смесь ИУК + ГК					
Контроль	80	-	-	-	-
60+80	79	53	23	2-4	2,6
80+80	85	78	51	3-8	3,5
100+80	96	52	32	2-7	2,4
НСР ₀₁ 0,72					
Смесь НУК + ГК					
Контроль	82	-	-	-	-
60+80	73	42	27	1-3	1,7
80+80	89	67	48	1-4	2,1
100+80	94	51	28	1-4	2,0
НСР ₀₁ 0,54					
Смесь ИУК + кинетин					
Контроль	80	-	-	-	-
60+50	68	59	7	1	1,0
80+50	73	58	15	1-2	1,6
100+50	70	46	3	1	1,0
НСР ₀₁ 0,17					

4.7. Влияние экзогенных фитогормонов на рост разновозрастных зародышей хлопчатника

В комбинации скрещивания *G.hirsutum L. x G.anomalum Waw.*, в отличие от других вариантов, гибридные семена, полученные

после обработки 2-дневных завязей фитогормонами, оказались недоразвитыми – сформированные зародыши занимали лишь 60-70 % объема семени. У них были хорошо сформированы осевые органы, семядольные листья скручены вокруг корешка, к моменту созревания имели нормальную форму зародыша, но относительно малые размеры. После высева этих семян в грунт наблюдалась очень низкая всхожесть, полученные проростки были слабыми и, в большинстве своем, погибали.

Для получения нормальных растений при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.anomalum* Waw., 30-35-дневные зародыши культивировались *in vitro* на искусственной питательной среде, разработанной для хлопчатника [15, 26]. При этом наблюдалась пауза в росте и развитии асептически высеянных гибридных зародышей в течение 30-40 дней. Мы предположили, что это может быть связано с переходом гибридных зародышей в возрасте 30-35 дней после опыления в состояние покоя за счет изменения баланса эндогенных фитогормонов.

Литературные данные указывают, что регулирование покоя и прорастание семян осуществляется балансом стимуляторов и ингибиторов [94, 138, 261]. По мнению А.А.Кхан, К.Л.Тао [261] гиббереллины необходимы для прорастания любых семян. Покой семян вызывается присутствием ингибиторов, действие которых снимается цитокининами.

В процессе эмбриогенеза меняется не только уровень, но и набор фитогормонов. В большинстве случаев покой семян связан с низким содержанием гиббереллинов, ауксинов, цитокининов, а также высоким содержанием абсцизовой кислоты и фенольных ингибиторов [94, 138]. Все эти данные указывают на то, что искусственным изменением баланса фитогормонов *in vitro* можно вывести семена из состояния глубокого покоя и вызвать прорастание гибридных зародышей. В связи с этим перед нами встала задача – изучить влияние экзогенных фитогормонов на переход к росту разновозрастных зародышей хлопчатника *in vitro*.

Результаты проведенных исследований показали, что 16-дневные зародыши на питательной среде *in vitro* переходили к росту на 15-18-й день культивирования. Обработка этих зародышей фитогормонами не привела к существенному изменению роста пророс-

тков. 18-20-дневные зародыши при культивировании *in vitro* без гормонов не переходили к росту. Обработка же их фитогормонами привела к нормальному развитию зародышей с образованием стебля и корня (рис. 9, 10).

У зародышей 22-24-дневного возраста без использования фитогормонов наблюдалось замедление роста. У данных зародышей была отмечена различная реакция к различным фитогормонам. Так, если ИУК фактически не повлияла на рост зародышей, то кинетин и ГК значительно ускорили рост гипокотилей и корней.

Зародыши с 26- до 40-дневного возраста в контрольных вариантах даже при длительном культивировании *in vitro* не приступали к росту и сохраняли свои размеры. В этот период рост гипокотиля и корня вызвали кинетин и гиббереллин. В отдельных случаях наблюдалось незначительное раскрытие семядольных листьев и позеленение точек роста. Из эпикотилия развивались настоящие листья.

45-50-дневные зародыши (см. рис. 9, 10) хорошо росли и без обработки фитогормонами. Обработка способствовала лишь увеличению размеров гипокотиля и корня. 60-дневные зародыши очень быстро приступали к росту на искусственной питательной среде *in vitro*, а обработка фитогормонами, как в предыдущем варианте, только увеличивала размеры проростков.

Таким образом, из полученных результатов видно, что с 18-го дня после опыления зародыши на искусственной питательной среде без вмешательства экзогенных фитогормонов не переходят к росту. На основании этого можно сделать вывод, что зародыши хлопчатника, начиная с 26- по 40-дневный возраст, входят в глубокий покой. Искусственным введением фитогормонов удастся изменить баланс гормонов в меристематических тканях зародыша, вследствие чего происходит прорастание. Прервать покой зародышей этого возраста удастся использованием кинетина и гиббереллина. Это указывает на то, что при погружении зародышей в покой в них уменьшается количество фитогормонов из класса цитокининов и гиббереллинов. Это подтверждается работами И.А.Ивановой [94, 138].

Семена хлопчатника относятся к классу быстро выходящих из покоя, о чем свидетельствует то, что зародыши от 45- до 60-днев-

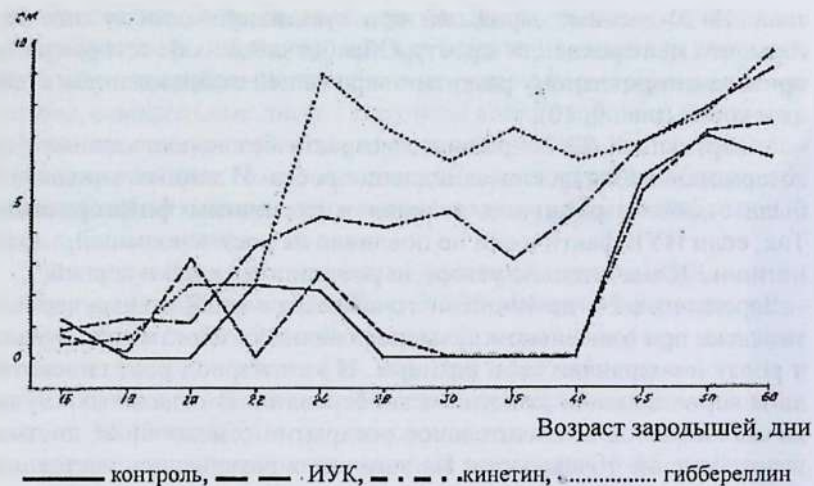


Рис. 9. Влияние фитогормонов на рост гипокотилия разновозрастных зародышей хлопчатника сорта 108-Ф *in vitro*

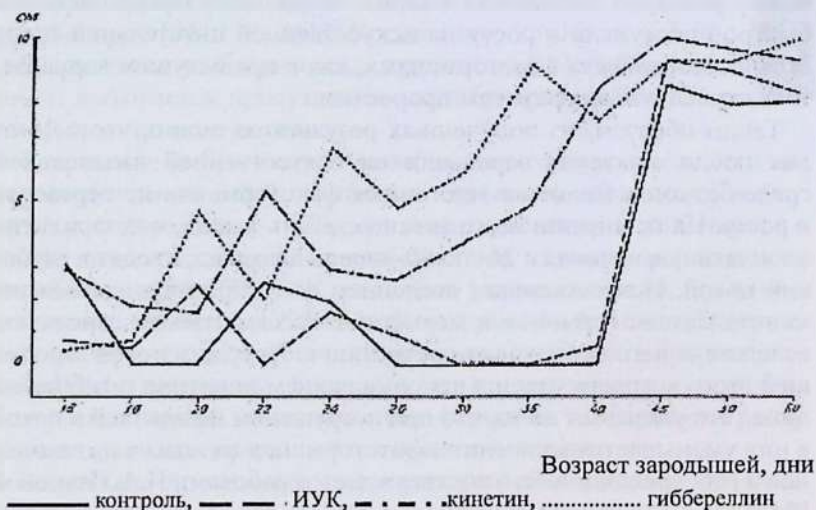


Рис. 10. Влияние фитогормонов на рост корня разновозрастных зародышей хлопчатника сорта 108-Ф *in vitro*

ного возраста даже при культивировании без фитогормонов легко переходят к росту. Это, вероятно, связано с тем, что ингибиторы прорастания накапливаются в семядольных листьях, а экзогенные фитогормоны, в основном, изменяют баланс гормонов в меристематических тканях, стимулируя рост зародышей.

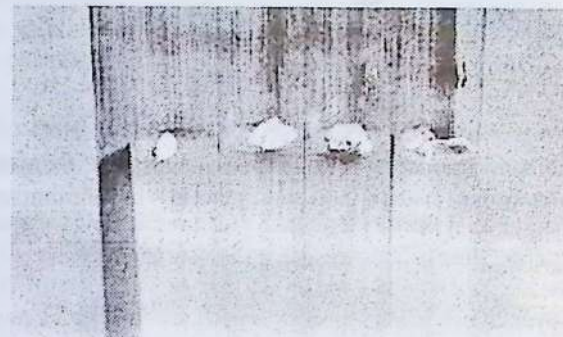


Рис. 11. Влияние раствора ИУК (100 мг/л) на рост зародышей хлопчатника (слева – контроль, справа – обработанные)

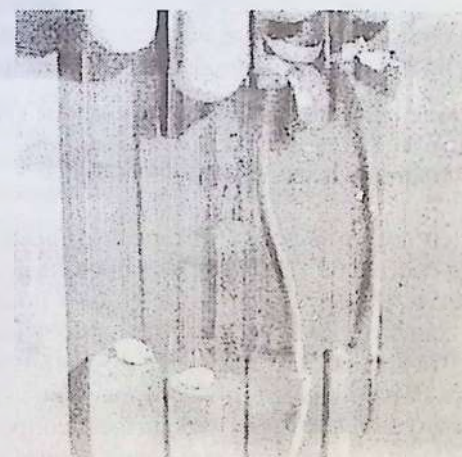


Рис. 12. Влияние раствора кинетина (50 мг/л) на рост зародышей хлопчатника (слева – контроль, справа – обработанные)

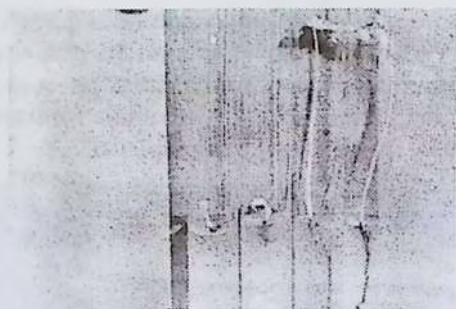


Рис. 13. Влияние раствора гибберелловой кислоты (70 мг/л) на рост зародышей хлопчатника (слева – контроль, справа – обработанные)

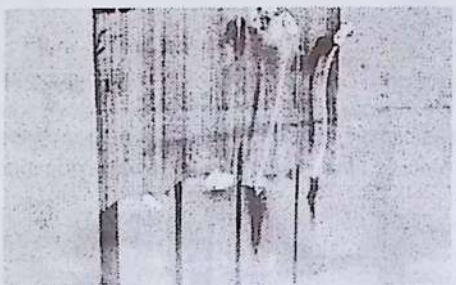


Рис. 14. Влияние раствора гибберелловой кислоты (70 мг/л) на рост гибридных зародышей *G.hirsutum* L. x *G.anomalum* Waw. (слева – контроль, справа – обработанные)

В связи с этим представлялось интересным выявление особенностей влияния растворов трех фитогормонов на рост 30-дневных зародышей *in vitro*. Проведенные исследования показали, что растворы ИУК в концентрации 100 мг/л не влияют на рост зародышей (рис. 11). Поверхностная обработка 30-дневных зародышей в условиях асептики растворами гибберелловой кислоты (70 мг/л) и кинетина (50 мг/л) вызывает рост зародышей, сопровождающийся нормальным развитием гипокотили и корня *in vitro* (рис. 12, 13).

Руководствуясь результатами, полученными по развитию зародышей сортов вида *G.hirsutum* L., 30-35-дневные гибридные зародыши обрабатывали раствором гибберелловой кислоты (70 мг/л)

и получили нормальное развитие растений. Как установлено (см. рис. 14), обработанные фитогормонами зародыши довольно быстро переходят к росту и нормально развиваются, а не обработанные – в течение 30-40 дней культивирования так и не приступают к росту. Через 40-50 дней культивирования гибридные растения были пересажены в грунт, где продолжали дальнейшее развитие. Данный метод приемлем для обеспечения высокого выхода гибридных растений *G.hirsutum* L. x *G.anomalum* Waw.

4.8. Влияние экзогенных фитогормонов на формирование семян при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.sturtii* F. Müell.

Дикий австралийский вид *G.sturtii* F. Müell с геномным обозначением C₁ филогенетически значительно далек от тетраплоидного вида *G.hirsutum* L. Исследователи [43] отмечают, что у гибрида *G.hirsutum* L. x *G.sturtii* F. Müell. в мейозе наблюдается 33 одиночных и 3 парных хромосомы, тем не менее, несовместимость здесь преодолевается легче, чем в предыдущих трех вариантах гибридизации.

В данном варианте гибридизации, в отличие от других рассмотренных вариантов, в контроле (без участия фитогормонов) наблюдалось некоторое число сохранившихся завязей и формирование в них гибридных семян в пределах от 1 до 4 штук.

При гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.sturtii* F. Müell. все исследуемые фитогормоны оказали положительное влияние на преодоление нескрещиваемости и регуляцию формирования семян. Так, даже низкая концентрация ИУК (10 мг/л) эффективно влияла на сохранение скрещенных завязей и способствовала образованию большого числа гибридных семян (табл. 14). При этом предел колебаний количества семян в одной коробочке составлял от 2 до 16 штук, в среднем 6,2. При повышении концентрации ИУК от 20 до 100 мг/л удалось сохранить до 50% коробочек. В этих случаях образуется гораздо больше семян, чем в контроле. Количество сохранившихся коробочек мало меняется в зависимости от концентрации ИУК. Но наибольший предел колебаний количества сформированных семян наблюдается при концентрации ИУК 100 мг/л, в отдельных случаях образуется до 24 семян в коробочке. Данные второго года исследований показывают, что применение ИУК эф-

фективно способствует преодолению нескрещиваемости при данной комбинации так же, как и в первый год (см. табл. 14).

Таблица 14

Влияние β -пидолилуксусной кислоты на завязываемость и формирование семян при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.sturtii* F. Müell

Концен-трация растворов, мг/л	Количество			Предел колебаний количества семян в коробочке, шт.	Среднее количество семян в коробочке, шт.
	обработанных завязей, шт.	сохранившихся кор-обочек, %	коробо-чек с семсна-ми, %		
Первый год исследований					
Контроль	86	27	13	1-2	1,2
10	82	35	32	2-16	6,0
20	84	42	31	3-18	6,9
40	82	48	43	3-8	6,1
60	83	46	46	4-14	7,3
80	80	47	46	3-18	7,7
100	82	50	45	7-24	12,8
НСР ₀₁ 1,21					
Второй год исследований					
Контроль	60	4	3	1-2	1,2
10	57	42	26	2-14	7,2
20	55	47	35	2-19	6,4
40	54	30	19	3-11	5,6
60	52	33	31	3-15	8,4
80	54	37	31	3-16	8,1
100	53	43	42	6-24	10,9
НСР ₀₁ 1,92					

Довольно успешная скрещиваемость между *G.hirsutum* L. и *G.sturtii* F. Müell. наблюдается и при обработке завязей синтетическими ауксинами НУК и 2,4-Д (табл. 15, 16). В предыдущих комбинациях скрещивания НУК и 2,4-Д фактически не оказывали влияния на процесс оплодотворения. Возможно, при данной комбинации гибридизации нарушения в индукции митотических делений небольшие, поэтому растворы любых фитогормонов, активируя физиологические процессы, нормализуют ход развития гибридного зародыша и эндосперма. Кроме того, нарушения, веро-

ятно, не связаны с функционированием разных гаплоидных наборов хромосом в одной цитоплазме, которые требуют специфических фитогормонов и их определенных концентраций.

Таблица 15

Влияние α -нафтилуксусной кислоты на завязываемость и формирование семян при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.sturtii* F. Müell

Концентрация растворов, мг/л	Количество			Предел колебаний количества семян в коробочке, шт.	Среднее количество семян в коробочке, шт.
	обработанных завязей, шт.	сохранившихся коробочек, %	коробочек с семенами, %		
Первый год исследований					
Контроль	100	23	14	2-4	3,3
10	99	23	13	2-8	5,3
20	99	37	37	5-20	10,1
40	98	30	18	7-8	9,1
60	106	46	42	8-24	14,4
80	106	65	59	4-20	12,3
100	104	75	70	6-33	12,8
НСР ₀₁ 5,08					
Второй год исследований					
Контроль	60	4	2	1-2	1,2
10	60	24	22	3-7	3,4
20	59	39	36	5-21	12,4
40	58	27	25	7-21	9,5
60	58	64	56	6-30	16,4
80	57	73	71	4-12	13,3
100	59	73	68	6-36	12,2
НСР ₀₁ 3,42					

Растворы гибберелловой кислоты во всех концентрациях в несколько раз повышают завязываемость, по сравнению с контролем (табл. 17). При этом в опыте в каждой коробочке формируется в 3-3,5 раза больше семян, чем в контроле. Результаты второго года исследований аналогичны первому. Действие различных концентраций ГК по влиянию на сохранение завязей и формирование семян при изучаемой схеме гибридизации хлопчатника между собой отличались незначительно.

Такую же картину можно наблюдать и при изучении влияния различных концентраций кинетина и БАП (табл. 18, 19). Как видно из табл. 18 и 19, кинетин и БАП в отдельных случаях способствуют образованию до 26-37 семян в одной коробочке. БАП так же, как НУК и 2,4-Д действует на преодоление барьера нескрещиваемости лишь при гибридизации *G.hirsutum L. x G. sturtii F. Müell.* Двухлетнее испытание цитокининов показало, что растворы кинетина и БАП почти одинаково влияют на формирование семян при гибридизации *G.hirsutum L. x G. sturtii F. Müell.*

Таблица 16

Влияние 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты на завязываемость и формирование семян при гибридизации *G.hirsutum L. x G.sturtii F. Müell.*

Концентрация растворов, мг/л	Количество			Предел колебаний количества семян в коробочке, шт.	Среднее количество семян в коробочке, шт.
	обработанных завязей, шт.	сохранившихся коробочек, %	коробочек с семенами, %		
Первый год исследований					
Контроль	98	10	7	1-2	1,2
10	16	71	59	8-16	11,4
20	102	56	44	5-21	12,0
40	104	52	34	13-24	18,9
60	105	54	39	14-25	21,1
80	88	26	13	12-17	13,6
100	90	35	29	10-15	16,4
НСР ₀₁ 3,96					
Второй год исследований					
Контроль	61	4	1	1-2	1,2
10	59	59	56	12-26	17,6
20	62	44	42	5-23	12,3
40	58	29	25	13-26	18,2
60	59	36	32	14-25	19,5
80	61	20	19	11-18	12,6
100	60	34	31	9-25	16,4
НСР ₀₁ 3,26					

Таблица 17

Влияние гибберелловой кислоты на завязываемость и формирование семян при гибридизации *G.hirsutum L. x G.sturtii F. Müell.*

Концентрация растворов, мг/л	Количество			Предел колебаний количества семян в коробочке, шт.	Среднее количество семян в коробочке, шт.
	обработанных завязей, шт.	сохранившихся коробочек, %	коробочек с семенами, %		
Первый год исследований					
Контроль	75	14	11	3-4	3,3
10	78	57	42	2-17	10,1
20	78	62	56	9-18	12,9
40	80	60	50	9-24	13,5
60	79	48	37	3-20	13,0
80	81	50	43	4-22	13,2
100	78	68	62	10-26	14,6
НСР ₀₁ 3,38					
Второй год исследований					
Контроль	70	5	5	2-4	1,9
10	63	48	43	2-20	8,5
20	63	62	59	8-20	12,8
40	62	61	55	8-26	12,9
60	61	57	51	4-21	11,0
80	60	62	56	4-24	14,2
100	60	70	68	10-28	15,3
НСР ₀₁ 2,26					

Смеси фитогормонов ИУК с ГК и НУК с ГК оказались менее эффективными по влиянию на завязываемость гибридных семян. При этом наблюдаются отдельные коробочки, содержащие по одному гибриднему семени (табл.20).

Из испытанных смесей фитогормонов более эффективной оказалась смесь ИУК с кинетином. При использовании смеси ИУК (80 мг/л) и кинетин (50 мг/л) отмечается образование до 28 семян в коробочке. При обработке завязей этой смесью при гибридизации *G.hirsutum L. x G.sturtii F.Müell.* наблюдается довольно большой процент сохранившихся коробочек, из которых 52 % с семенами.

Семена, полученные при обработке экзогенными фитогормонами при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.sturtii* F. Müell., полноценные, имеют хорошую всхожесть. Проростки развиваются без аномалий.

Таблица 18

Влияние кинетина на завязываемость и формирование семян при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.sturtii* F. Müell.

Концентрация растворов, мг/л	Количество			Предел колебаний количества семян в коробочке, шт.	Среднее количество семян в коробочке, шт.
	обработанных завязей, шт.	сохранившихся коробочек, %	коробочек с семенами, %		
Первый год исследований					
Контроль	90	16	12	2-4	2,5
10	82	67	62	5-16	9,9
20	82	70	70	6-26	14,8
40	80	57	50	8-20	9,5
60	78	84	75	4-27	14,4
80	78	92	87	1-22	12,7
100	78	70	62	3-30	14,2
НСР _ш 2,77					
Второй год исследований					
Контроль	62	6	1	1-2	1,2
10	56	69	63	5-18	10,0
20	57	82	73	6-28	15,2
40	57	63	53	7-24	11,1
60	58	86	72	4-22	14,2
80	58	86	83	3-37	12,7
100	56	66	57	6-28	15,1
НСР _ш 3,79					

Таким образом, все испытанные экзогенные фитогормоны оказывали положительный эффект при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.sturtii* F. Müell., способствуя успешному преодолению барьера нескрещиваемости.

Таблица 19

Влияние 6-бензилламинопурина на завязываемость и формирование семян при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.sturtii* F. Müell.

Концентрация растворов, мг/л	Количество			Предел колебаний количества семян в коробочке, шт.	Среднее количество семян в коробочке, шт.
	обработанных завязей, шт.	сохранившихся коробочек, %	коробочек с семенами, %		
Первый год исследований					
Контроль	79	16	7	1-3	1,6
10	79	58	49	5-24	11,7
20	76	40	25	15-19	16,3
40	80	34	18	17-21	20,0
60	78	48	30	6-24	13,2
80	79	65	50	9-23	14,4
100	78	65	50	8-21	15,3
					НСР _{от} 4,88
Второй год исследований					
Контроль	57	7	2	1-2	1,2
10	60	55	50	4-25	16,2
20	64	25	18	12-21	13,6
40	61	25	15	16-21	17,2
60	60	47	37	6-26	14,4
80	62	54	52	9-25	13,3
100	61	56	54	7-21	15,3
					НСР _{от} 2,54

Рост и развитие семяпочек при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.sturtii* F. Müell. проходят различно в зависимости от того, использованы фитогормоны или нет. Нами отмечено, что семяпочки в завязях, не обработанных фитогормонами, на третий день начинают постепенно высыхать (рис. 15). В отдельных случаях отставание в росте семяпочек начинается с 5-6 дня после опыления. Чаще всего на 5 день после опыления семяпочки нижней части завязи постепенно дегенерируют (рис. 16), похожие процессы происходят у самоопыленных сортов. Через сутки при обработке 2-дневных завязей большинство семяпочек имеют вид нормально развивающихся (рис. 17). Однако, спустя 5-6 дней после опыления становятся заметны различия в развитии семяпочек в пределах одной

завязи. Так, нормально оплодотворенные семяпочки очень хорошо развиваются, плотно лежат в завязи (рис. 18). В этой же завязи встречаются неоплодотворенные семяпочки, которые на определенном этапе прекращают свое развитие и высыхают. На 10-й день после опыления четко видно, что нормально оплодотворенные семяпочки под воздействием экзогенных фитогормонов продолжают рост и развитие, тогда как неоплодотворенные семяпочки к этому времени уже дегенерируют (рис. 19). Образованные гибридные семяпочки продолжают свое развитие до созревания.

Таблица 20

Влияние смесей фитогормонов на завязываемость и формирование семян при гибридизации *G.hirsutum L. x G.sturtii F. Müell.*

Концентрация растворов, мг/л	Количество			Предел колебаний количества семян в коробочке, шт.	Среднее количество семян в коробочке, шт.
	обработанных завязей, шт.	сохранившихся корбочек, %	коробочек с семенами, %		
1	2	3	4	5	6
Смесь ИУК + ГК					
Первый год исследований					
Контроль	86	12	10	1-5	2,8
60+80	87	67	59	2-24	7,1
80+80	86	84	81	1-21	8,7
100+80	88	80	73	2-26	11,6
НСР ₀₁ 2,85					
Второй год исследований					
Контроль	58	10	10	2-7	2,5
60+80	61	62	61	2-24	5,5
80+80	60	87	83	2-23	8,3
100+80	61	82	79	2-24	11,9
НСР ₀₁ 2,90					
Смесь ИУК + ГК					
Первый год исследований					
Контроль	90	9	9	1-4	2,7
60+80	86	61	47	1-16	5,5
80+80	86	75	70	1-17	5,6
100+80	86	67	55	1-16	5,5
НСР ₀₁ 1,13					

Продолжение табл. 20

1	2	3	4	5	6
Второй год исследований					
Контроль	61	8	2	1	1,0
60+80	60	57	53	1-12	5,4
80+80	62	65	63	1-19	5,3
100+80	61	52	48	1-19	5,5
НСР ₀₁ 1,57					
Смесь ИУК + кинетин					
Первый год исследований					
Контроль	86	22	11	2-5	2,3
60+50	86	73	55	2-18	8,6
80+50	88	71	52	4-28	13,6
100+50	88	43	35	4-19	10,3
НСР ₀₁ 2,41					
Второй год исследований					
Контроль	83	10	8	2-4	1,9
60+50	95	53	58	2-13	10,0
80+50	94	70	66	3-30	10,4
100+50	95	36	34	5-15	9,4
НСР ₀₁ 2,43					

Обобщая полученные результаты, необходимо отметить, что обработка экзогенными фитогормонами при гибридизации *G.hirsutum L. x G.sturtii F. Müell* дает наибольшее число полноценных гибридных семян из всех рассмотренных вариантов гибридизации хлопчатника.

Итак, на основе проведенных исследований установлены самые эффективные фитогормоны и их сочетания, а также оптимальные концентрации в плане преодоления нескрещиваемости для каждой конкретной изученной комбинации скрещивания. Для обработки завязей при гибридизации *G.hirsutum L. x G.raimondii Ulbr.* рекомендуется использовать раствор кинетина (40 мг/л), при гибридизации *G.hirsutum L. x G.thurberi Tod.* – смесь ИУК (100 мг/л) с гибберелловой кислотой (80 мг/л), при *G.hirsutum L. x G.anomalum Waw.* – раствор гибберелловой кислоты (80 мг/л) и при *G.hirsutum L. x G.sturtii F. Müell.* – смесь ИУК (80 мг/л) с кинетином (50 мг/л).

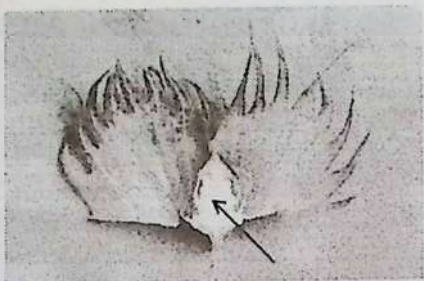


Рис. 15. Развитие 3-дневных семязпочек при гибридизации *G. hirsutum* L. x *G. sturtii* F. Müell. без обработки экзогенными фитогормонами (контроль)



Рис. 16. Развитие 5-дневных семязпочек при гибридизации *G. hirsutum* L. x *G. sturtii* F. Müell. без обработки экзогенными фитогормонами (контроль)

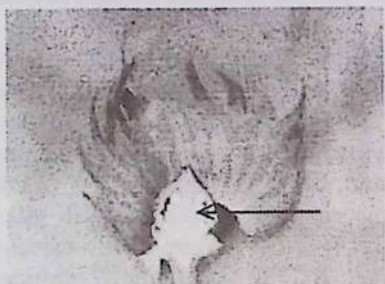


Рис. 17. Развитие 3-дневных семязпочек при гибридизации *G. hirsutum* L. x *G. sturtii* F. Müell., обработанных экзогенными фитогормонами



Рис. 18. Развитие 6-дневных семязпочек при гибридизации *G. hirsutum* L. x *G. sturtii* F. Müell., обработанных экзогенными фитогормонами

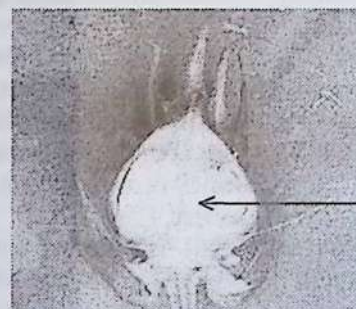


Рис. 19. Развитие 10-дневных семязпочек при гибридизации *G. hirsutum* L. x *G. sturtii* F. Müell., обработанных экзогенными фитогормонами

4.9. Распределение меченого фитогормона в генеративных органах при обработке завязей хлопчатника

Как отмечалось, фитогормоны усиливают многие физиолого-биохимические процессы в клетках растений. При этом фитогормоны могут участвовать непосредственно в изучаемом процессе, или, активируя одни процессы, усиливать другие физиологические функции клеток.

На основании полученных данных по действию фитогормонов на эмбриогенез при гибридизации отдаленных видов хлопчатника сделаны предположения, что, во-первых, экзогенные фитогормоны могут усиливать физиологические процессы в тканях 2-дневных завязей и, тем самым, стимулировать развитие зародыша и

эндосперма, во-вторых, экзогенные фитогормоны в цитоплазме зиготических клеток могут активизировать деление клеток.

Для изучения распределения меченой гибберелловой кислоты, после обработки ею 2-дневных завязей, через 0,5; 1; 3; 6; 24; 48 ч. завязи собирали для анализа. Завязь делили на части в следующем порядке: стенка (кожура) завязи, лист, близлежащий к завязи, прилистник, основание завязи, семяпочки 1, 2, 3, 4 сверху вниз, плацента — верхняя, средняя и нижняя части. Сырую массу каждой части взвешивали в бюксах, после чего переносили в сцинтилляционные флаконы. Последние с содержимым погружали в жидкий азот до замораживания растительного материала и ставили в лиофилизационную камеру. После лиофильной сушки материал тщательно перемалывали, после чего добавляли по 1 мл гиамина в метаноле и ставили в термостат при температуре +60° С на 20 ч. Затем для обесцвечивания использовали по несколько капель перекиси водорода. После охлаждения использовали по 0,5 мл ледяной уксусной кислоты, затем — по 12 мл сцинтилляционной смеси и закладывали в счетчик Гейгера. Результаты выражались в импульсах в минуту на грамм сырого вещества.

Данные исследования показали, что при поверхностной обработке 2-дневных завязей гибберелловой кислотой, меченой C^{14} , уже после 30 мин. отмечается наличие метки в стенке завязи, прилистнике, листе, непосредственно питающем завязь, в плаценте и даже в семяпочках. Во всех изученных вариантах межвидовой разнохромосомной гибридизации хлопчатника наибольшее число импульсов наблюдается в верхней части плаценты и в семяпочках, расположенных ближе к вершине завязи.

В двух вариантах гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.thurberi* Tod., *G.hirsutum* L. x *G.sturtii* F. Müell. после первого взятия пробы (через 30 мин. после обработки) резко уменьшается число импульсов в биомассе, полученной из тканей листа. Возможно, это связано с оттоком фитогормонов из листа к плодоорганам вместе с питанием, образовавшимся в процессе фотосинтеза.

Активность импульсов в биомассе из тканей семяпочки и других частей завязи в пробах, взятых через 1, 3 и 6 ч. особо не различается. Заметное уменьшение числа импульсов в расчете на грамм сырого вещества в тканевом материале из всех семяпочек и из различных участков плаценты отмечалось через 24 ч. после обработ-

ки. Возможно, это связано с интенсивным ростом завязи, за счет чего происходит разбавление проникших меченых фитогормонов в расчете на сырой вес.

Через 48 ч. после обработки также наблюдалось постепенное снижение числа импульсов. Здесь необходимо отметить, что в верхней части плаценты и семяпочках, прикрепленных к этой части, накапливается значительно больше фитогормонов, нежели в других семяпочках и частях завязи.

Через 16 дней после обработки изучалась число импульсов в биомассе из тканей дифференцированных зародышей и эндосперма. В данном случае отмечалась более высокая число импульсов в тканевом материале, полученном во всех комбинациях скрещивания. Это является доказательством того, что после обработки 2-дневных завязей экзогенными фитогормонами, последние проникают до зиготы и эндосперма и участвуют в регуляции их физиологических процессов.

Таким образом, полученные результаты показывают, что при поверхностной обработке 2-дневных завязей экзогенные фитогормоны проникают во все части завязи вплоть до семяпочек, зиготических и эндоспермальных клеток.

Эти данные являются доказательством участия экзогенных фитогормонов в регуляции эмбрио- и эндоспермогенеза при гибридизации разнохромосомных видов хлопчатника, а, следовательно, в преодолении барьера нескрещиваемости.

4.10. Изучение влияния экзогенных фитогормонов на цитозмбриологические процессы при разнохромосомной гибридизации хлопчатника

Для изучения влияния экзогенных фитогормонов на цитозмбриологические процессы при гибридизации разнохромосомных видов хлопчатника 2-дневные завязи при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.raimondii* Ulbr. обрабатывали раствором кинетина (40 мг/л), *G.hirsutum* L. x *G.thurberi* Tod. — раствором смеси ИУК (100 мг/л) с ГК (80 мг/л), *G.hirsutum* L. x *G.anomalum* Waw. — раствором ГК (80 мг/л) и *G.hirsutum* L. x *G.sturtii* F. Müell. — раствором смеси ИУК (80 мг/л) с кинетином (50 мг/л).

Изучалось по 100 и более семяпочек каждого рассматриваемого

срока всех четырех вариантов гибридизации хлопчатника. Семяпочки через 2, 3, 4, 6 дней после опыления фиксировали в растворе Карнуа (6:3:1) по З.П.Паушевой [142]. Дальнейшая обработка материала проводилась по общепринятой цитозембриологической методике: материал парафинировали в термостате при температуре 58°C в течение трех суток. Для получения микротомных срезов использовали салазочный и ротационный микротомы. Толщина срезов 12-20 мкм. Препараты окрашивали гематоксилином по Гейденгайну и реактивом Шиффа и просматривали их под микроскопами МБИ-3, МБР-3. Микрофотографии выполнялись с помощью микрофотонасадок МФН-11 и МФН-12.

Результаты исследований показали, что в подавляющем большинстве случаев, во всех рассмотренных комбинациях скрещивания без обработки фитогормонами пыльцевые трубки не проходят в семяпочки и оплодотворения не происходит. В таких зародышевых мешках видны неслившиеся полярные ядра и хорошо сохранившиеся синергиды (рис. 20).

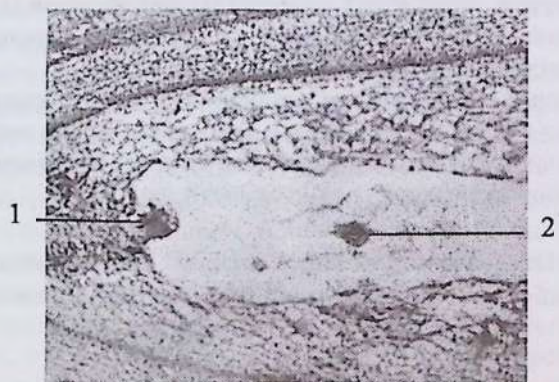


Рис. 20. Неоплодотворённая семяпочка при отдалённой межвидовой гибридизации хлопчатника (*G.hirsutum* L. x *G.anomalum* Waw.):

1 – синергиды;

2 – неслившиеся полярные ядра

Иногда пыльцевые трубки, хотя и медленно, но дорастали до семяпочки, входили в зародышевый мешок и изливали свое содержимое. В этих случаях оплодотворение происходило, в основном,

на третьи сутки после опыления. При отдаленных скрещиваниях часто отмечаются нарушения процесса оплодотворения, которые препятствуют нормальному прохождению эмбрио- и эндоспермогенеза. Даже в пределах одной завязи можно встретить семяпочки, как с нормально оплодотворенным зародышевым мешком (рис. 21, 22), так и со всевозможными нарушениями.

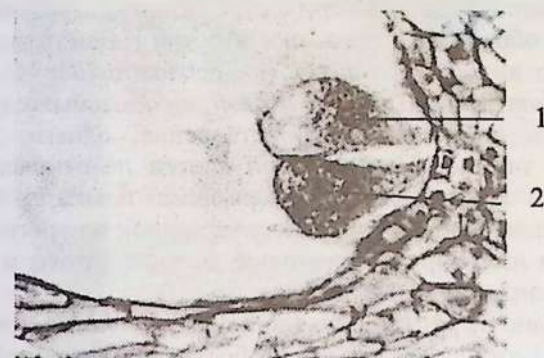


Рис. 21. Оплодотворённая яйцеклетка (зигота) (1) и сохранившаяся синергида (2) (*G.hirsutum* L. x *G.anomalum* Waw.):



Рис. 22. Первичное ядро эндосперма (3 n) *G.hirsutum* L. x *G.anomalum* Waw.

Исследования 4-суточных семяпочек показали, что образовавшаяся зигота и оплодотворенная эндоспермальная клетка не имеют дальнейшего деления и на 5-6-е сутки после опыления такие завязи

оппадают. В просмотренных контрольных препаратах ни в одном варианте гибридизации не отмечено первичного деления клеток зиготы или эндосперма, хотя при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.sturtii* F. Müell. в контрольных вариантах отмечалось формирование полноценных семян (см. ранее). Возможно, для фиксации семяпочек в данной гибридизации не были использованы удачные варианты, где можно было бы увидеть нормальное развитие зародышей.

Таким образом, установлено, что при гибридизации разнохромосомных видов *G.hirsutum* L. с *G.raimondii* Ulbr., *G.thurberi* Tod., *G.anomalum* Waw., *G.sturtii* F. Müell. в отдельных случаях можно наблюдать нормальное оплодотворение, однако, дальнейшего развития зиготы и центральной клетки не отмечено. Обработка завязей экзогенными фитогормонами показала, что гормоны, поступившие извне в зародышевый мешок на третий день после опыления индуцируют первичное деление зиготы и образование ядерного эндосперма.

Как видно на рис. 23, при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.sturtii* F. Müell. через сутки после обработки, т.е. на третий день после опыления, наблюдается нормальное деление зиготы и образуется двухклеточное проэмбрио, состоящее из апикальной и базальной клеток. Первое деление зиготы чаще всего происходит поперечно, но иногда, особенно при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.anomalum* Waw., встречаются случаи продольного или косого заложения перегородки после деления зиготы (рис. 24). Такое anomальное деление зиготы, возможно, связано, во-первых, с отдаленной разнохромосомной гибридизацией, во-вторых, с влиянием экзогенных фитогормонов, которые действуют не только на индукцию деления клеток, но и на их рост. Под влиянием экзогенных фитогормонов гибридные семяпочки увеличиваются в размерах, имеют довольно длинное волокно даже при отсутствии оплодотворения. Такое явление наблюдается в основном, в вариантах, где завязи обработаны растворами ИУК и ГК.

После обработки растворами экзогенных фитогормонов деление зиготы происходит различно, в зависимости от вариантов скрещивания. Например, при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.thurberi* Tod. на вторые сутки после обработки растворами ИУК и ГК или же на четвертые сутки после опыления, зигота только готовится к делению, тогда как эндосперм уже многоядерный (рис. 25).



Рис. 23. Двуклеточный проэмбрио (*G.hirsutum* L. x *G.sturtii* F. Müell.)



Рис. 24. Двуклеточный проэмбрио (1) и ядерный эндосперм (2) (*G.hirsutum* L. x *G.anomalum* Waw.)



Рис. 25. Зигота (1) перед делением и ядерный эндосперм (2) (*G.hirsutum* L. x *G.thurberi* Tod.)

На четвертые сутки после обработки во всех комбинациях скрещивания, где произошло нормальное оплодотворение, наблюдаются многоклеточные шаровидные проэмбрио (рис. 26, 27).



Рис. 26. Многоклеточный проэмбрио (*G. hirsutum* L. x *G. raimondii* Ulbr.)

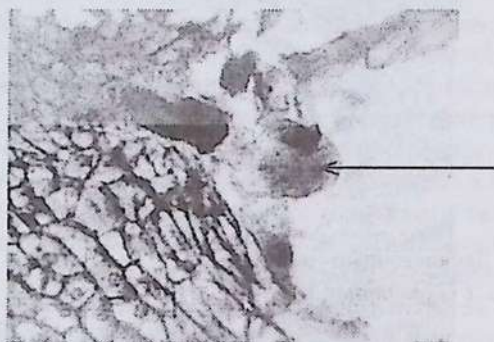


Рис. 27. Многоклеточный проэмбрио (*G. hirsutum* L. x *G. thurberi* Tod.).

Таким образом, на основании цитозембриологических данных показано, что при отдаленной разнохромосомной гибридизации хлопчатника оплодотворения, как правило, не происходит, за редким исключением. При нормальном оплодотворении дальнейшее развитие зародыша и эндосперма прекращается на разных этапах. При этом роль экзогенных фитогормонов заключается в том, что они регулируют нормальное деление ядер и клеток, что в конечном итоге обеспечивает образование полноценных семян.

Обобщая полученные данные, можно сделать заключение, что

несовместимость при разнохромосомной гибридизации проявляется в сингамной фазе. Полагаем, что использование экзогенных фитогормонов стимулирует рост пыльцевых трубок в столбике и завязи, а также процесс продвижения спермиев после попадания их в зародышевый мешок к яйцеклетке и центральному ядру.

Подтверждением такого предположения может служить то, что экзогенные фитогормоны очень легко и быстро проникают в ткани 2-дневных завязей хлопчатника — уже через 30 минут после обработки фитогормоны обнаружены во всех частях завязи. Это свидетельствует о непосредственном участии фитогормонов в физиолого-биохимических процессах в семязпочках в период опыления и после него. Наши исследования подтверждают мнение многих исследователей [42, 56, 301], что при отдаленной межвидовой гибридизации хлопчатника в большинстве случаев оплодотворение происходит на третьи сутки после опыления.

Растворы всех растительных гормонов способствуют сохранению определенного количества скрещенных завязей. При этом необходимо отметить, что не все гормоны влияют на регуляцию эмбриогенеза и формирование гибридных семян. Несмотря на то, что во всех рассмотренных нами четырех комбинациях скрещивания в качестве материнской формы участвовал *G. hirsutum* L., для каждой комбинации характерны свои оптимальные концентрации и сочетания фитогормонов. Это свидетельствует о том, что несовместимость при отдаленной межвидовой гибридизации хлопчатника (именно в данных комбинациях) проявляется в нарушении регуляторной системы двух разнохромосомных генотипов в одной цитоплазме.

Фитогормоны или смеси фитогормонов в каждом конкретном варианте гибридизации способны действовать как регуляторы деления зиготы и эндосперма, а замена их другим фитогормоном дает другой эффект. Это, в свою очередь, свидетельствует о том, что нарушения в функционировании генома видоспецифично. Что касается положительного влияния, хотя и в разной степени, при гибридизации *G. hirsutum* L. x *G. sturtii* F. Müell., то это, по-видимому, связано с тем, что характерные для этой комбинации не очень глубокие нарушения при действии любых фитогормонов легко регулируются и индуцируется нормальное развитие гибридного зародыша и эндосперма, чем обеспечивается получение значительно большего количества полноценных семян, чем в контроле.

При использовании оптимальных концентраций фитогормонов у каждого гибридного варианта формируется различное количество семян. Наибольшее их количество наблюдается при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.sturtii* F. Müell. и наименьшее - *G.hirsutum* L. x *G.thurberi* Tod. Это связано со степенью совместимости скрещиваемой пары на уровне рыльца и столбика, обеспечивающей прорастание достаточного количества пыльцевых трубок и, естественно, протекания процесса оплодотворения. Это также можно объяснить систематической близостью родительских видов хлопчатника. Еще Ф.М.Мауер [124] отмечал, что вид *G.sturtii* F. Müell. хорошо скрещивается с Д-геномными видами. Исследователь З.А.Эрназарова [198] утверждает, что виды внутри С-геномной группы слабо и трудно скрещиваются между собой, завязываемость коробочек и семян у них низкая. Разногеномные Д и С формы скрещиваются сравнительно хорошо, завязываемость коробочек здесь колеблется в пределах 1,7-55,5%, завязываемость семян - 30,8-54,7%.

Экзогенные фитогормоны при разнохромосомной гибридизации влияют не только на эмбриогенез, но и способствуют активизации роста эпидермальных клеток, образующих волокно. Отмечено, что даже при отсутствии оплодотворения, под влиянием фитогормонов увеличиваются размеры клеток нуцеллуса, внутреннего и наружного интегументов семяпочки. Такие явления наблюдаются, в основном, при участии растворов ИУК и ГК.

Таким образом, физиологические нарушения при межвидовой гибридизации хлопчатника связаны с фитогормональным дисбалансом, возникающим при гибридизации отдаленных видов и неблагоприятно влияющим на прохождение оплодотворения и эмбриогенеза. Проведение фитогормональной коррекции позволяет восстановить нормальный ход эмбриогенеза.

ГЛАВА 5

РАЗЛИЧНЫЕ СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ОТДАЛЕННЫХ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ ХЛОПЧАТНИКА

Из проведенных нами исследований и многих литературных источников следует, что для каждой конкретной гибридизации отдаленных видов необходимо разрабатывать индивидуальные биотехнологические подходы и методики. Так, если в одних комбинациях для получения гибридных семян достаточна обработка физиологически активными веществами, то в других комбинациях необходимо применение более сложных методов биотехнологии: эмбриокультуры, культуры семяпочек, клеточной селекции, генной инженерии и т.д.

Из существующего огромного количества диплоидных видов хлопчатника наибольший интерес для селекции представляют виды *G.arboreum* L., *G.herbaceum* L., *G.anomalum* Waw., *G.thurberi* Tod., *G.davidsonii* Kell., *G.klotzschianum* Anderss., *G.aridum* Skov., *G.armorianum* Kear., *G.harknessii* Brand., *G.australe* F. Müell., *G.raimondii* Ulbr., *G.triphyllum* Hochr., *G.bickii* Prok. и др. как доноры признаков устойчивости к стресс-факторам внешней среды, скороспелости, качества волокна и т.д.

В связи с этим, нами были проведены исследования по получению гибридов между сортами вида *G.hirsutum* L. и вышеперечисленными диплоидами.

5.1. Гормональная регуляция эмбриогенеза *in vitro* при гибридизации *G.arboreum* L. x *G.hirsutum* L., *G.herbaceum* L. x *G.hirsutum* L.

Так, при гибридизации *G.arboreum* L. x *G.hirsutum* L., *G.herbaceum* L. x *G.hirsutum* L. 4-6-дневные после опыления завязи высевали в асептических условиях на агаризованную питательную среду MS, в которую добавляли фитогормоны (2,4-Д, ИУК, НУК, кинетин, гиббереллин, БАП) в различных концентрациях и сочетаниях. Критерием оценки исследований служила степень дифференциации гибридных зародышей.

На питательной среде MS без фитогормонов в данных комбина-

циях скрещивания развитие семян не происходит. А присутствие в среде ИУК и кинетина дает положительные результаты. В первые 5-7 дней культивирования они увеличиваются в размере, затем на их поверхности начинают интенсивно индуцироваться каллусные клетки серо-кремового цвета. Через 35-40 дней всю поверхность питательной среды в колбе занимают каллусные клетки. При этом, семена не разрушены. Анатомическое вскрытие их показало, что наружные и внутренние интегументы утолщены, сформированный зародыш плотно лежит в микропиллярной части, имеет белый цвет и твердую структуру. Зародыши, дифференцированные в оплодотворенных семяпочках на искусственной среде, значительно отличаются от зародышей гибридов *in vivo*. Если у последних семядольные листья полукруглой формы светло-зеленого цвета и короткий корешок, то у зародышей, сформированных *in vitro*, удлиненный гипокотиль и толстые бугоркообразные семядольные белые листья.

Существует классификация по дифференциации зародышей при соматическом эмбриогенезе хлопчатника *in vitro* по S.R. Shoemaker et al. [313], которая состоит из следующих фаз: глобулярной, сердечковидной, тюльпановидной и зрелой. Наши исследования подтвердили, что при зиготическом эмбриогенезе *in vitro* при отдаленной межвидовой гибридизации хлопчатника зародыши формируются по данной классификации до зрелого состояния. Однако в зависимости от концентраций и сочетаний ИУК и кинетина в среде гибридные зародыши на стадии «зрелости» отличаются как по размеру, так и по степени дифференциации, отчего зависит переход зародышей к росту при субкультивировании.

В связи с этим зрелые зародыши нами были разделены на три группы: со сформированным корешком и семядольными листьями (3,5-4,0 мм), с хорошо развитым корешком и слабо развитыми семядольными листьями (2,0-2,5 мм) и со слабо выраженными осевыми органами (1,5-1,8 мм). Здесь было установлено, что на средах без фитогормонов 85-90% зародышей первой группы и 40-50% зародышей второй группы нормально росли и развивались. Зародыши из третьей группы на этих средах к росту не приступали.

На примере рассматриваемых вариантов гибридизации были проведены исследования по изучению влияния различных концентраций ИУК и кинетина в составе среды MS на соматический эмбриогенез. Полученные данные показали, что при сочетании

низких и высоких концентраций фитогормонов 60-80% семяпочек растут нормально, остальные разрушаются или не развиваются. Это указывает на то, что материнские семяпочки *G. arboreum* L. и *G. herbaceum* L. в культуре *in vitro* реагируют на изменение баланса ауксинов и цитокининов незначительно. От них, в основном, зависит эмбриональное развитие гибридного зародыша. При низких концентрациях ИУК и кинетина в среде в 5-10% нормально развитых семяпочек дифференцируются зародыши третьей группы. В средах с кинетином в концентрации 0,2 мг/л и различной концентрацией ИУК формируются зародыши второй и третьей групп. С повышением концентрации кинетина (0,5 мг/л) и ИУК (1,7-2,0 мг/л) выход гибридных зародышей увеличивается до 40-50%, особенно в среде с кинетином (1 мг/л) и ИУК (1,4-2,0 мг/л). При таких концентрациях около 25-30% зародышей относится к первой группе, 20% - ко второй и 10-15% - к третьей (рис. 28).

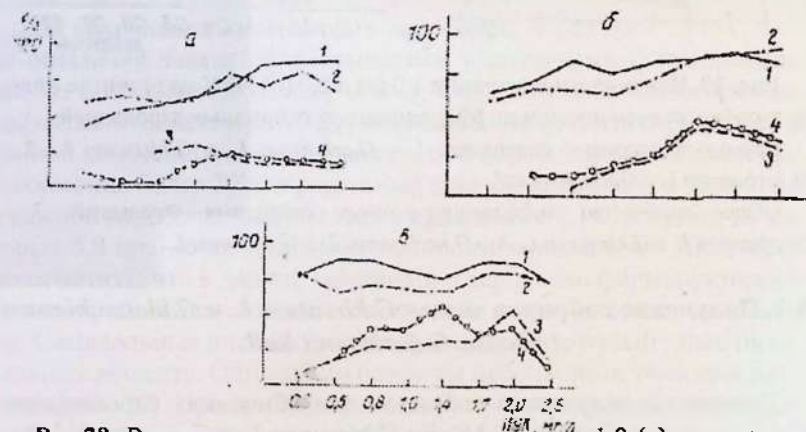


Рис. 28. Влияние концентрации ИУК (а) и кинетина (б) на развитие оплодотворенных семяпочек и дифференциацию гибридных зародышей

При концентрации ИУК 1 мг/л дифференциация зародышей первой группы отмечена редко. Здесь, в основном, формируются зародыши второй (12-15%) и третьей (9-13%) групп (рис. 29).

При повышении в среде концентрации ИУК до 2 мг/л и кинети-

на от 0,8 до 1,2 мг/л, выход дифференцированных зародышей возрастает до 60-65%, из которых 30-35% относятся к первой группе, 15-20% - ко второй и 6-13% - к третьей.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что растительные гормоны ИУК и кинетин в концентрации соответственно 1,8-2,0 и 0,8-1,2 мг/л регулируют нормальное протекание эмбриогенеза *in vitro* и дифференциацию гибридных зародышей с хорошо развитыми осевыми органами при гибридизации *G. arboreum* L. x *G. hirsutum* L., *G. herbaceum* L. x *G. hirsutum* L. и дифференциацию гибридных зародышей с хорошо развитыми осевыми органами.

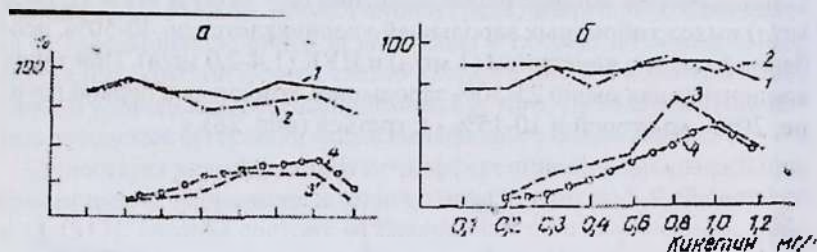


Рис. 29. Влияние концентрации 1,0 (а) и 2,0 (б) ИУК на развитие оплодотворенных семязпочек и дифференциацию гибридных зародышей:

Нормально развитые семязпочки: 1 - *G. arboreum* L. x *G. hirsutum* L., 2 - *G. herbaceum* L. x *G. hirsutum* L.;

Общее количество дифференцированных гибридных зародышей: 3 - *G. arboreum* L. x *G. hirsutum* L., 4 - *G. herbaceum* L. x *G. hirsutum* L.

5.2. Получение гибридов между *G. hirsutum* L. и *G. klotzschianum* Anderss., *G. davidsonii* Kell.

Данные по получению гибридов в комбинациях скрещивания *G. hirsutum* L. x *G. sturtii* F. Müell., *G. hirsutum* L. x *G. raimondii* Ulbr., *G. hirsutum* L. x *G. thurberi* Tod., *G. hirsutum* L. x *G. anomalum* Waw. приведены в главе 4.

Использование в гибридизации вида хлопчатника *G. klotzschianum* Anderss. очень привлекательно, так как данный вид отличается высокой устойчивостью к стресс факторам внешней среды и высокой плодовитостью [10, 124]. Этот вид является фотопериодически чувствительным - короткодневным растением. Вид хорошо цветет

в теплице в период короткого дня (апрель-май, октябрь-ноябрь). Однако он очень плохо скрещивается с сортами *G. hirsutum* L.

Таблица 21
Дифференциация зародышей при гибридизации *G. hirsutum* L. x *G. klotzschianum* Anderss. после обработки 2-дневных завязей экзогенными фитогормонами

Количество скрещиваний, шт.	Количество обработанных завязей, т.	Количество сохранившихся коробочек, шт.	Среднее количество семян в коробочке, шт.	Среднее количество семян с дифферен. зародышем шт.
42 (обработанные)	42	30	7,1	5,8
40 (не обработанные)	-	-	-	-

Для сохранения скрещенных коробочек, через двое суток после опыления завязи обрабатывались экзогенными фитогормонами. Из приведенной табл.22 видно, что экзогенные фитогормоны эффективно действуют на формирование гибридных зародышей в данной комбинации скрещивания - при обработке растворами фитогормонов более 70% скрещенных завязей сохраняется. При этом в каждой коробочке развивается в среднем по 7,1 шт. семян, из которых 5,8 шт. - с дифференцированными зародышами. Необходимо отметить, что в данной комбинации зародыши формируются до более взрослого состояния и заполняют почти всю полость семени. Семязольные листья скручены, несут достаточный запас питательных веществ. Однако они покрыты небольшими темными пятнами (рис. 30). При культивировании таких зародышей, хотя они и хорошо переходят к росту, дальнейшее их развитие на искусственной питательной среде сопровождается почернением семязольных листьев (рис. 31). Данный нежелательный фактор является причиной остановки развития гибридных зародышей *in vitro*.

Более 200 шт. гибридных зародышей *G. hirsutum* L. x *G. klotzschianum* Anderss. разного возраста и размеров высевались на питательные среды. Все они приступали к росту, но, к сожалению, постепенно чернели и погибали.

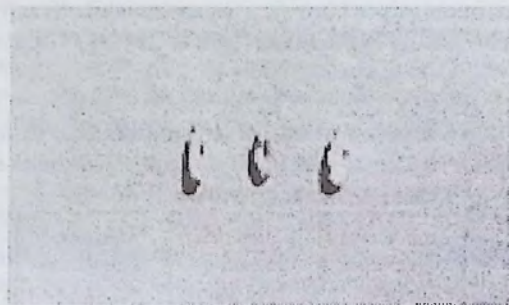


Рис. 30. 30-дневные гибридные зародыши *G. hirsutum* L. x *G. klotzschianum* Anderss., полученные обработкой экзогенными фитогормонами



Рис. 31. Гибридные зародыши *G. hirsutum* L. x *G. klotzschianum* Anderss. в культуре *in vitro*

Дальнейшие исследования были направлены на подбор оптимальных питательных сред для культивирования семян *in vitro* в данной комбинации скрещивания.

Семяпочки культивировались в более молодом возрасте (3-дневные после опыления), когда еще отсутствовало наличие темных пятен. Так, на среде *BT* с добавлением фитогормонов ИУК и гибберелловой кислоты удалось получить нормальное развитие семяпочек в течение 35-40 дней культивирования (см. табл. 22).

Наибольшее количество нормально развитых семяпочек *in vitro* наблюдается в варианте с ИУК в концентрации 0,6 мг/л и гибберелловой кислотой – 1,8 мг/л, что соответствует концентрациям,

предложенным *Beasley, Ting* [218] для нормального роста волокна на семяпочках *in vitro*. Повышение концентрации ИУК и снижение ГК в среде приводит к разрушению культивируемых семяпочек. На данной среде при культивировании оплодотворенных семяпочек получить формирование гибридного зародыша не удалось.

Таблица 22

Рост 3-дневных после опыления семяпочек на среде *Beasley-Ting* при гибридизации *G. hirsutum* L. x *G. klotzschianum* Anderss.

Концентрация фитогормонов		Количество семяпочек, шт.	Семяпочки, шт.			Семена с зародышами, шт.
ИУК, мг/л	ГК, мг/л		недоразвитые	разрушенные	нормально развитые	
0,1	1,8	25	6	16	3	-
0,2	1,8	25	8	10	7	-
0,4	1,8	24	4	14	6	-
0,6	1,8	26	4	12	10	-
0,8	1,8	26	2	20	4	-
1,0	1,8	27	-	25	2	-
1,4	0,5	25	-	23	2	-
1,6	0,5	26	-	26	-	-
1,8	0,5	25	-	25	-	-
2,0	0,5	25	2	22	1	-

Далее исследования проводили на среде *MS*, которая, в отличие от среды *BT*, содержит в 2,5 раза меньше KNO_3 . В среде *MS* значительно ниже концентрация витаминов тиамин- HCl и пиридоксин- HCl , и она дополнена 1200 мг/л NH_4NO_3 . На этой среде опыт проводили в четырех вариантах (табл. 23). В варианте без витаминов в темноте около 50% семяпочек развиваются нормально, но без формирования гибридного зародыша. При освещении же на данной среде с 1,8 мг/л ГК и 0,5 мг/л ИУК развитие почти всех семяпочек протекает в норме, но при этом, также не наблюдается формирования зародышей.

Известно, что световой фактор при культивировании семяпочек играет важную роль. Так, на среде *BT* с 1,8 мг/л ГК и 0,5 мг/л ИУК на свету более 90% семяпочек развивались нормально, против 47% - в темноте. Однако и здесь также не удалось дифференцировать зародыши.

Таблица 23
Развитие 3-дневных семян G.hirsutum L. x G.klotzschianum Anderss. в различных условиях культивирования

Условия культивирования	Количество семяпочек, шт.	Семяпочки, шт.			Семена с зародышами, шт.
		недоразвитые	разрушенные	нормально развитые	
Питательная среда MS без витаминов					
+32°С в темноте	48	-	24	24	-
+26°С на свету	48	3	1	44	-
Питательная среда MS с витаминами					
+32°С в темноте	48	-	11	37	-
+26°С на свету	48	1	-	47	-
Питательная среда BT					
+32°С в темноте	100	-	53	47	-
+26°С на свету	100	8	1	91	-

Такие же результаты были получены и в комбинации *G.hirsutum L. x G.davidsonii Kell.*

После всех тщетных попыток в наших исследованиях диплоидный вид *G.davidsonii Kell.* был использован в качестве материнской формы. Из приведённой табл. 24 видно, что при скрещивании *G.davidsonii Kell.* с тремя сортами вида *G.hirsutum L.* ни в одном варианте не удалось сохранить ни одной коробочки, а после обработки 2-дневных после опыления завязей наблюдалось сохранение 30-40 % плодоеlementов.

Данные коробочки в условиях теплицы в течение 35-40 дней сохранялись на растениях. При созревании коробочек в них были обнаружены по 7-8 неразвитых зародышей. При проведении анатомического анализа 20-25-дневных семян обнаружено, что развитие внутренних и наружных интегументов протекает нормально, на поверхности семян наблюдается слой эпидермальных клеток и образование волосков. Однако, ни в одном из рассмотренных семян не отмечено развитие зародышей. Это говорит о том, что в данном варианте гибридизации либо пылевая трубка не дошла до яйцеклет-

ки, и оплодотворения не произошло, либо экзогенные фитогормоны не способствовали регулированию первичного деления зиготы.

Таблица 24
Влияние растворов фитогормонов (ИУК + гибберелловая кислота) на сохранение плодоеlementов при гибридизации G.davidsonii Kell. x G.hirsutum L.

Комбинации скрещивания	Количество скрещиваний, шт.	Сохранявшиеся коробочки, шт.	Коробочки с дифференцированными зародышами, шт.
Контроль — без обработки фитогормонами			
<i>G.davidsonii Kell. x C-6530</i>	60	-	-
<i>G.davidsonii Kell. x C-6524</i>	84	-	-
<i>G.davidsonii Kell. x 108-Ф</i>	56	-	-
Опыт — обработка фитогормонами			
<i>G.davidsonii Kell. x C-6530</i>	79	16	-
<i>G.davidsonii Kell. x C-6524</i>	104	38	-
<i>G.davidsonii Kell. x 108-Ф</i>	88	31	-

Таким образом, показаны различные пути получения отдаленных межвидовых гибридов хлопчатника применительно к конкретным комбинациям гибридизации:

- культивирование 2-3-суточных семян с последующим изолированием и культивированием незрелых зародышей *in vitro* до формирования растений. Положительные результаты получены в комбинациях: *G.arboreum x G.hirsutum*, *G.herbaceum x G.hirsutum*;
- обработка семян на 2-3 день после опыления фитогормонами *in vivo*, вычленение и культивирование *in vitro* незрелых триплоидных зародышей. Показано на комбинациях *G.hirsutum x G.bickii*, *G.hirsutum x G.klotzschianum*, *G.hirsutum x G.davidsonii*; *G.hirsutum x G.triphyllum*, *G.hirsutum x G.harknessii*;
- обработка завязей фитогормонами *in vivo* и получение полноценных триплоидных семян при гибридизациях *G.hirsutum x G.raimondii*, *G.hirsutum x G.thurberi*, *G.hirsutum x G.sturtii*, *G.hirsutum x G.anomalum*.

ГЛАВА 6

ПОЛУЧЕНИЕ АМФИДИПЛОИДОВ ХЛОПЧАТНИКА И ИХ БЕККРОСС-ПОТОМСТВА

Успех в работе по созданию сортов с требуемыми параметрами зависит, прежде всего, от наличия ценного исходного материала для селекции и правильного его подбора со стороны селекционера. Опыт отечественной и зарубежной селекции показывает, что одним из наиболее эффективных источников нового формо- и видообразования является отдаленная межвидовая гибридизация.

В роде *Gossypium* L. многие виды отличаются отдельными уникальными хозяйственно-ценными признаками. Например, представитель генома «Д» вид *G. aridum* Skov. отличается устойчивостью к заболеванию вилтом, особенно расе Б, засухоустойчив, в потомстве даёт крепкое тонкое волокно [10, 119, 125]. Австралийский вид *G. sturtii* F. Müell. (геном «С») обладает устойчивостью к сосущим вредителям, засухе и засолению, отличается высокой плодовитостью и т.д. [10, 124]. Вид *G. triphyllum* Hochr., относящийся к геному «В», обладает устойчивостью к низким температурам, плодовитый, высокоурожайный, даёт вилтоустойчивое, солеустойчивое потомство [124]. *G. harknessii* Brand. (геном «Д») имеет опадающий прицветник, является кустогамной формой, высокоурожайный; *G. raimondii* Tod. (геном «Д») имеет крепкое, нежное волокно, слабо поражается вилтом, устойчив к засухе, сосущим вредителям [124] и т.д.

Как видно из предыдущего раздела, экзогенные фитогормоны способны регулировать процесс эмбриогенеза при межвидовой разнохромосомной гибридизации хлопчатника. Так, в комбинациях скрещивания *G. hirsutum* L. x *G. sturtii* F. Müell., *G. hirsutum* L. x *G. raimondii* Ulbr., *G. hirsutum* L. x *G. thurberi* Tod., *G. hirsutum* L. x *G. anomalum* Waw. с помощью обработки завязей экзогенными фитогормонами были получены полноценные семена, а из них — триплоидные растения.

На приведенных схематических рисунках полученных триплоидных растений хлопчатника (рис. 32-35) видно промежуточное наследование формы листа, бутона и цветка. Все полученные гибриды в теплице росли интенсивно и отличались мощностью. Так как растения были стерильными, возникла необходимость их полиплоидизации, которую можно было достичь путем колхицинирования.

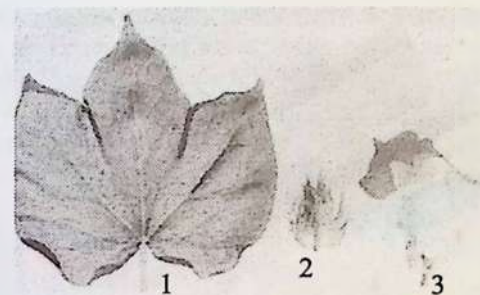


Рис. 32. Элементы растения *G. hirsutum* L. x *G. anomalum* Waw. ($2n = 39$):
1 — лист; 2 — цветочный бутон; 3 — цветок

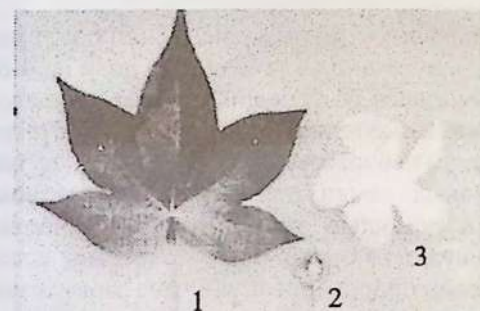


Рис. 33. Элементы растения *G. hirsutum* L. x *G. thurberi* Tod. ($2n = 39$):
1 — лист; 2 — цветочный бутон; 3 — цветок

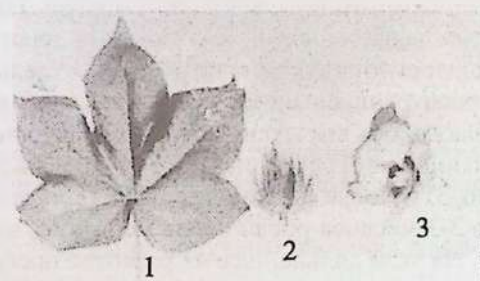


Рис. 34. Элементы растения *G. hirsutum* L. x *G. anomalum* Waw. ($2n = 39$):
1 — лист; 2 — цветочный бутон; 3 — цветок

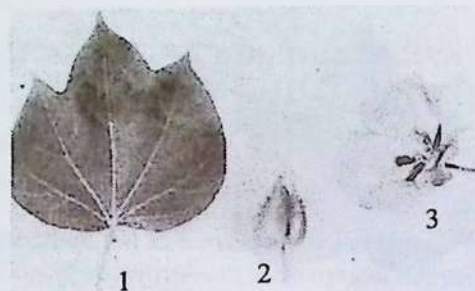


Рис. 35. Элементы растения *G. hirsutum* L. x *G. sturtii* F. Müell. ($2n=39$):
1 — лист; 2 — цветочный бутон; 3 — цветок

Для этого капельно обрабатывались точки роста растений 0,05-0,1% растворами колхицина в течение 5-6 дней по 4-6 раз. Однако данный метод оказался безуспешным — нам не удалось получить полиплоидизированные ветви у триплоидных гибридов.

Так как в нашей лаборатории, благодаря методу массового получения гибридных семян при отдаленной разнохромосомной гибридизации с помощью экзогенных фитогормонов, имелось достаточное количество семян, были проведены исследования по колхицинированию проросших семян. Для этого семена замачивались в воде. Через двое суток проростки переносили в 0,05-0,1% растворы колхицина на 12, 24, 30, 36, 48, 56, 68, 76 ч. По окончании времени экспозиции проростки извлекали из растворов, промывали и высевали в бумажные стаканчики с почвой. На 5-7-е сутки получали всходы с утолщенными, короткими гипокотильями, которые в течение длительного времени не росли. В отдельных случаях из точек роста распускались аномальные листья, и у большинства проростков наблюдалось высыхание семядольных листьев.

Действие колхицина в экспозициях 12, 36 и 76 ч. было почти одинаковым (рис. 36, 37). После колхицинирования сохранившиеся растения в течение 2-3 месяцев росли очень медленно, достигая всего 5-10 см высоты. На этом дальнейшее их развитие прекращалось.

Среди изученных вариантов удалось сохранить лишь те растения, которые были получены из проростков, корешки которых до посадки в грунт замачивались на 1-2 ч. в 0,05-0,1%-ных растворах

колхицина. В данном случае наблюдалось высыхание семядольных листьев по краям. При этом точка роста имела возможность расти (рис. 38). После образования эпикотиля с двумя настоящими листочками, семядольные листья опадали (рис. 39). Дальнейшее развитие растений проходило нормально.

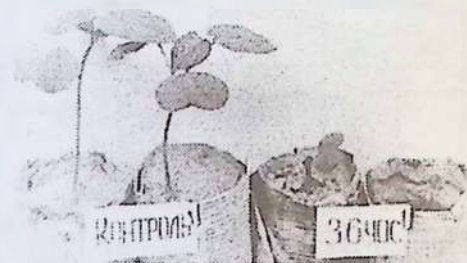


Рис. 36. Растения триплоидных гибридов F_1 *G. hirsutum* L. x *G. sturtii* F. Müell., обработанные 0,05-0,1 %-ным раствором колхицина



Рис. 37. Растения триплоидных гибридов F_1 *G. hirsutum* L. x *G. sturtii* F. Müell., обработанные 0,05-0,1 %-ным раствором колхицина

Таким способом были получены растения с удвоенным числом хромосом (в нашем опыте — гексаплоиды). Об их полиплоидизации судили по сохранению плодозлементов на растениях.

Так, в нашей лаборатории были получены гексаплоидные амфидиплоиды F_1 108-Ф (*G. hirsutum* L.) x *G. raimondii* Ulbr., F_1 108-

Ф (*G. hirsutum* L.) x *G. sturtii* F. Müell. При беккроссировании этих амфидиплоидов с сортами С-6524 и С-4727 не удалось сохранить ни одной коробочки. Во избежание этого, на вторые сутки после опыления завязи обрабатывали экзогенными фитогормонами. Полученные результаты приведены в табл. 25.



Рис. 38. Растения триплоидных гибридов F_1 *G. hirsutum* L. x *G. sturtii* F. Müell., обработанные 0,05-0,1 %-ным раствором колхицина



Рис. 39. Растения триплоидных гибридов F_1 *G. hirsutum* L. x *G. sturtii* F. Müell., обработанные 0,05-0,1 %-ным раствором колхицина

Таблица 25
Действие фитогормонов на дифференциацию гибридных зародышей хлопчатника

Гибридная комбинация	Вариант	Количество скрещиваний, шт.	Количество сохранившихся коробочек, шт.	Количество коробочек с дифференцированными зародышами, шт.	Количество зародышей в 1-й коробочке, шт.	
					предел колебаний	среднее
1	2	3	4	5	6	7
С-6524 x F_1 С-6524 x <i>G. sturtii</i> F. Müell	Контроль	109	4	-	-	-
	Опыт	118	105	95	3-11	5
С-4727 x F_1 С-6524 x <i>G. sturtii</i> F. Müell	Контроль	130	1	-	-	-
	Опыт	172	147	139	2-9	5
С-6524 x F_1 108-Ф x <i>G. raimondii</i> Ulbr	Контроль	107	3	-	-	-
	Опыт	139	87	81	3-7	5
С-4727 x F_1 108-Ф x <i>G. raimondii</i> Ulbr	Контроль	94	2	-	-	-
	Опыт	111	90	79	4-8	5
С-6524 x <i>G. bickii</i> Prok.	Контроль	50	-	-	-	-
	Опыт	85	76	-	-	-
С-6524 x <i>G. davidsonii</i> Kell.	Контроль	225	-	-	-	-
	Опыт	195	154	136	1-6	3
С-4727 x <i>G. davidsonii</i> Kell.	Контроль	205	2	-	-	-
	Опыт	218	188	160	1-6	3
С-6524 x <i>G. klotzschianum</i> Anderss	Контроль	110	3	-	-	-
	Опыт	151	114	90	2-8	4
С-4727 x <i>G. klotzschianum</i> Anderss	Контроль	71	2	-	-	-
	Опыт	90	87	69	2-6	5
С-6524 x <i>G. australe</i> F. Müell	Контроль	79	1	-	-	-
	Опыт	97	78	1	1	1

Примечание: Опыт — обработанные фитогормонами двухдневные после опыления завязи; в графе 5 при гибридизации *G. hirsutum* L. x *G. davidsonii* Kell. указано количество полноценных семян.

Установлено, что при беккроссировании амфидиплоидов с сортами вида *G. hirsutum* L. при использовании экзогенных фитогормонов сохраняется большая часть скрещенных коробочек, которые, в основном, имеют сформированные гибридные зародыши. Последние имеют хорошо дифференцированные осевые органы размером 3-4 мм. Однако развития эндосперма не наблюдается, в связи с чем данные зародыши культивировали на питательной среде *in vitro* [15], и получили цветущие растения F_1BC_1 (C-6524 x F_1 108-Ф x *G. sturtii* F. Müell), F_1BC_1 (C-4727 x F_1 108-Ф x *G. sturtii* F. Müell), F_1BC_1 (C-6524 x F_1 108-Ф x *G. raimondii* Ulbr.). Самоопыленные коробочки этих гибридов опадали, но при вторичном беккроссировании их с сортами C-6524 и C-4727 значительная часть плодоеlementов сохранялась.

В итоге проведенных исследований и полученных результатов нами была разработана схема получения амфидиплоидов хлопчатника и их беккросс-потомства (рис. 40). Как установлено, триплоидный амфидиплоид можно получить тремя способами:

- использованием экзогенных фитогормонов;
- через культуру *in vitro* незрелых зародышей;
- через культуру *in vitro* оплодотворенных семяпочек.

Затем триплоидные гибриды переводятся на гексаплоидный уровень с помощью колхицина.

Считаем уместным подчеркнуть, что при первом беккроссировании гексаплоидных амфидиплоидов с сортами культурных видов экзогенные фитогормоны способствуют образованию дифференцированных на осевые органы незрелых зародышей. Такое явление было отмечено при беккроссировании амфидиплоидов F_{14} *G. hirsutum* L. x *G. aridum* Skov., F_1 *G. hirsutum* L. x *G. raimondii* Ulbr., F_1 *G. hirsutum* L. x *G. sturtii* F. Müell. и F_1 *G. hirsutum* L. x *G. anomalum* Waw., F_{12} *G. hirsutum* L. x *G. triphyllum* Horch. Первое беккросспоколение данных амфидиплоидов было получено методом эмбриокультуры, а второе и третье беккросспоколение было получено при свободном скрещивании.

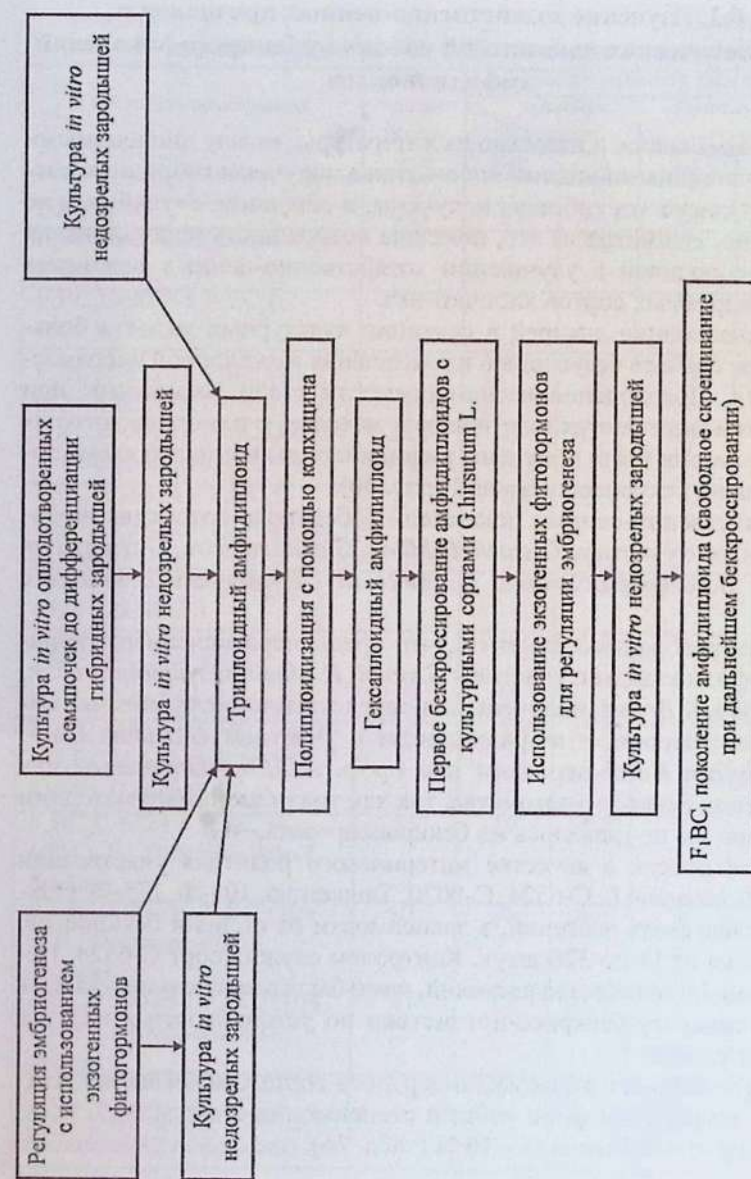


Рис. 40. Схема биотехнологических методов получения амфидиплоидов хлопчатника и их беккросс-потомства

6.1. Изучение хозяйственно-ценных признаков и технологических показателей волокна у беккросс-поколений амфидиплоидов

Как отмечалось и известно из литературы, между диплоидными и тетраплоидными видами хлопчатника получены гибридные растения. Однако эти гибриды получены, в основном, случайно, а не системно. Несмотря на это, показана возможность использования диких сородичей в улучшении хозяйственно-ценных признаков культивируемых сортов хлопчатника.

Использование диких сородичей в селекции культурных видов в большинстве случаев безуспешно из-за явления межвидовой несовместимости. Преодоление несовместимости стало возможным при использовании биотехнологических методов, с помощью которых в лаборатории были получены амфидиплоиды и создана схема получения их беккросс-поколений (рис. 40).

Хозяйственно-ценные показатели у беккросс-потомства амфидиплоидов с участием *G.sturtii* F. Müell., *G.aridum* Skov., *G.triphyllum* Horch., *G.harknessii* Brand., *G.raimondii* Ulbr. изучали, начиная с F_2BC_2 .

Здесь необходимо отметить, что среди перечисленных гибридов амфидиплоиды с участием *G.sturtii* F. Müell., *G.raimondii* Ulbr., *G.harknessii* Brand. получены непосредственно сотрудниками нашей лаборатории, а амфидиплоиды с участием *G.aridum* Skov., *G.triphyllum* Horch. переданы нам проф. А.Э.Эгамбердиевым для получения беккросс-потомства, так как традиционными методами селекции им не удавалось их беккроссировать.

В беккроссах в качестве материнского родителя участвовали сорта *G.hirsutum* L. C-6524, C-9070, Ташкент-6, 108-Ф, 175-Ф. Объем исследуемых растений, в зависимости от степени беккроссов, составлял от 11 до 326 штук. Контролем служил сорт C-6524. Независимо от количества растений, нами была сделана попытка дать характеристику беккросс-потомствам по устойчивости к вилту и скороспелости.

Заболеемость вилтом стандартного сорта C-6524 на искусственно зараженном фоне «общей степени» составила 34,7 %, из них «сильной степени» — 10 % (табл. 26).

Таблица 26
Заболеемость вилтом гибридов хлопчатника

Гибридная комбинация	Количество растений	Заболеемость вилтом			
		общей степени		в сильной степени	
		шт.	%	шт.	%
1	2	3	4	5	6
C-6524	262	91	34,7	26	10,0
F_2BC_2 Таш-6 x F_2BC_1 (C-6524 x <i>G.sturtii</i>)	35	7	20,0	2	5,7
F_2BC_2 C-9070 x F_2BC_1 (C-6524 x <i>G.sturtii</i>)	59	24	40,7	7	11,9
F_2BC_2 C-6524 x F_2BC_1 (C-6524 x <i>G.sturtii</i>)	326	175	53,7	71	21,8
F_2BC_2 C-9070 x F_2BC_2 C-6524 x F_1BC_1 <i>G.sturtii</i>)	224	97	43,3	19	8,5
F_2BC_2 C-6524 x F_2BC_2 C-6524 x F_1BC_1 (C-6524 x <i>G.sturtii</i>)	191	100	52,4	3	-
F_2BC_2 C-6524 x F_1BC_1 (C-6524 x <i>G.sturtii</i>)	251	71	28,3	22	8,8
F_2BC_1 C-6524 x F_2BC_2 C-6524 x F_1BC_1 (C-6524 x <i>G.sturtii</i>)	19	8	42,1	4	21,1
F_2BC_4 Таш-6 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 (C-6524 x <i>G.sturtii</i>)	10	3	30,0	-	-
F_2BC_2 C-6524 x F_2BC_1 (C-6524 x F_{14} <i>Deltapine-80</i> x <i>G.aridum</i>)	35	19	54,3	4	11,4
F_2BC_2 C-9070 x F_2BC_1 (108-Ф F_{14} <i>Deltapine-80</i> x <i>G.aridum</i>)	93	36	38,7	8	8,6
F_2BC_2 C-9076 x F_2BC_1 (108-Ф x F_{14} <i>Deltapine-80</i> x <i>G.aridum</i>)	81	17	21,0	8	9,9
F_2BC_2 Таш-6 x F_2BC_2 C-6524 x F_1BC_1 (108-Ф x F_{14} <i>Deltapine-80</i> x <i>G.aridum</i>)	102	40	39,2	14	13,7

Продолжение табл. 26

1	2	3	4	5	6
$F_2BC_3C-9070 \times F_1BC_2C-6524 \times F_1BC_1$ (108-Ф $\times F_{14}$ <i>Deltapine-80</i> $\times G.aridum$)	58	30	57,1	14	24,1
$F_2BC_3C-9070 \times F_1BC_2C-6524 \times F_1BC_1$ (108-Ф $\times F_{14}$ <i>Deltapine-80</i> $\times G.aridum$)	33	12	36,4	4	12,1
$F_2BC_3C-6524 \times F_1BC_2(F_1BC_1(108-Ф \times F_{14}$ <i>Deltapine-80</i> $\times G.aridum) \times C-6524$	82	41	50,0	9	11,0
$F_2BC_2(F_1BC_1108-Ф \times F_{14}$ <i>Deltapine-80</i> $\times G.aridum) \times C-6524$	39	15	38,5	3	7,7
$F_2BC_2C-6524 \times F_1BC_1(108-Ф \times F_{14}$ <i>Deltapine-80</i> $\times G.aridum$)	179	60	21,5	13	7,2
$F_2BC_1(108-Ф \times F_{14}$ <i>Deltapine-80</i> $\times$ <i>G.aridum</i>) $\times C-6524$	30	13	43,3	2	6,7
$F_2BC_4C-6524 \times F_1BC_3C-6524 \times F_1BC_2C-$ $6524 \times F_1BC_1(108-Ф \times F_{14}$ <i>Deltapine-</i> <i>80</i> $\times G.aridum$)	11	2	18,2	-	-
$F_2BC_4B-I \times F_1BC_3C-6524 \times F_1BC_2C-$ $6524 \times F_1BC_1(108-Ф \times F_{14}$ <i>Deltapine-80</i> $\times G.aridum$)	13	8	61,5	2	15,4
$F_2BC_4Tash-6 \times F_1BC_3C-6524 \times F_1BC_2C-$ $6524 \times F_1BC_1(108-Ф \times F_{14}$ <i>Deltapine-80</i> $\times G.aridum$)	24	5	20,8	1	4,2
$F_2BC_4C-6524 \times F_1BC_3C-6524 \times F_1BC_2C-$ $6524 \times F_1BC_1(108-Ф \times F_{14}$ <i>Deltapine-80</i> $\times G.aridum$)	30	6	20,0	3	10,0
$F_2BC_2Tash-6 \times F_1BC_1 \times 108-Ф \times F_{12}$ (<i>G.hirsutum</i> $\times G.triphyllum$)	73	17	23,3	4	5,5
$F_2BC_2C-9070 \times F_1BC_1108-Ф \times F_{12}(G.$ <i>hirsutum</i> $\times G.triphyllum$)	134	96	71,6	43	32,1
$F_2BC_2C-6524 \times F_1BC_1108-Ф \times F_{12}(G.$ <i>hirsutum</i> $\times G.triphyllum$)	239	107	44,8	40	16,7
$F_2BC_3C-9070 \times F_1BC_2C-6524 \times$ $F_1BC_1108-Ф \times F_{12}(G.hirsutum$ $\times$ <i>G.triphyllum</i>)	49	15	30,6	5	10,2
$F_2BC_3C-9070 \times F_1BC_2C-6524 \times F_1BC_1$ $108-Ф \times F_{12}(G.hirsutum$ $\times G.triphyllum$)	137	87	63,5	2,7	19,7

Продолжение табл. 26

1	2	3	4	5	6
$F_2BC_3C-6524 \times F_1BC_2C-6524 \times$ $F_1BC_1108-Ф \times F_{12}(G.hirsutum$ $\times$ <i>G.triphyllum</i>)	32	14	43,8	7	21,9
$F_2BC_1108-Ф \times F_{12}(G.hirsutum$ $\times$ <i>G.triphyllum</i>)	48	16	33,3	3	6,3
$F_1BC_4Tash-6 \times F_1BC_3Tash-6 \times F_1BC_2$ $C-6524 \times F_1BC_1108-Ф \times F_{12}(G.hirsu-$ <i>tum</i> $\times G.triphyllum$)	11	2	18,2	-	-
$F_1BC_4C-6524 \times F_1BC_3Tash-6 \times F_1BC_1$ $108-Ф \times F_{12}(G.hirsutum$ $\times G.triphyllum$)	16	5	31,3	1	6,3
$F_1BC_4B-I \times F_1BC_3Tash-6 \times F_1BC_2C-$ $6524 \times F_1BC_1108-Ф \times F_{12}(G.hirsutum$ $\times$ <i>G.triphyllum</i>)	11	5	45,5	1	9,1
$F_2BC_2C-9070 \times F_2BC_1108-Ф \times F_{12}(G.$ <i>hirsutum</i> $\times G.triphyllum$)	51	16	31,4	2	3,9
$F_2BC_2C-6524 \times F_2BC_1108-Ф \times F_1(G.$ <i>hirsutum</i> $\times G.harknessii$)	202	95	47,0	26	12,9
$F_2BC_3C-9070 \times F_1BC_2C-6524 \times F_1BC_1$ $108-Ф \times F_1(G.hirsutum$ $\times G.harknessii$)	241	115	41,6	21	8,7
$F_2BC_3C-6524 \times F_1BC_2C-6524 \times F_1BC_1$ $108-Ф \times F_1(G.hirsutum$ $\times G.harknessii$)	23	13	56,5	2	8,7
$F_2BC_1108-Ф \times F_1(G.hirsutum$ $\times$ <i>G.harknessii</i>)	62	23	37,1	6	9,7
$F_1BC_4C-6524 \times F_1BC_3C-9070 \times F_1BC_2$ $C-6524 \times F_1BC_1108-Ф \times F_1(G.hirsutum$ $\times G.harknessii$)	36	14	38,9	2	5,6
$F_1BC_3C-6524 \times F_1BC_2C-6524 \times F_1BC_1$ $C-6524 \times F_1108-Ф \times G.raimondii$	20	8	40,0	2	10,0
$F_1BC_3175-Ф \times F_1BC_2C-6524 \times F_1BC_1$ $C-6524 \times F_1108-Ф \times G.raimondii$	29	6	20,7	2	6,9
$F_2BC_3Tash-6 \times F_1BC_2C-6524 \times F_1BC_1$ $C-6524 \times F_1108-Ф \times G.raimondii$	125	5	20,0	-	-
$F_1BC_3B-I \times F_1BC_2C-6524 \times F_1BC_1C-$ $6524 \times F_1108-Ф \times G.raimondii$	16	6	37,5	1	6,3

Продолжение табл. 26

F_1BC_2 Б-2 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 C-6524 x F_1 108-Ф x <i>G. raimondii</i>	2 40	3 17	4 42,5	5 4	6 10,0
F_2BC_2 C-6524 x F_1BC_1 C-6524 x F_1 108-Ф x <i>G. raimondii</i>	363	109	30,7	35	15,2

Как видно, процент заболеваемости вилтом беккросс-потомства амфидиплоидов с участием *G. sturtii* F. Müell. в F_2BC_2 значительно выше стандарта, а в F_2BC_1 поколении при участии С-9070 и С-6524 в качестве материнского родителя около половины растений поражаются вилтом. Устойчивые к вилту популяции выделяются в третьем поколении BC_2 амфидиплоида. Здесь наблюдается более 70 % устойчивых к вилту растений.

Среди изученных беккросс-поколений с участием *G. aridum* Skov. высокая устойчивость к вилту гибридных популяций наблюдалась в F_2BC_2 . А при третьем беккроссировании устойчивость к вилту данной гибридной популяции снижалась. В F_3BC_2 отмечена высокая устойчивость к данному заболеванию.

Устойчивость гибридных популяций в беккросспоколениях также зависит от сортов вида *G. hirsutum* L., участвующих в качестве родителя (в нашем случае — материнской формы). Например, беккросспоколения амфидиплоида *G. hirsutum* L. x *G. triphyllum* при гибридизации с сортом Ташкент-6 в F_2BC_2 выщепляют растения со значительной устойчивостью к вилту. Здесь заболеваемость «общей степенью» составила 23,3 %. При беккроссировании этого же амфидиплоида с сортом С-9070 полученная гибридная популяция в F_2BC_2 поражалась вилтом на 71,6 %. Как видно из табл. 26, в беккросспоколениях с участием *G. triphyllum* Horch. устойчивых к вилту популяций получить не удалось. Такие же результаты были получены в беккросспоколениях с участием *G. harknessii* Brand.

Хотя по малой выборке судить трудно, но из табл. 26 видно, что в F_1BC_2 поколении амфидиплоида с участием *G. raimondii* Ulbr. наблюдаются гибриды со значительной устойчивостью к вилту, по сравнению со стандартным сортом С-6524.

Так как посев семян беккросс-поколений проводился рендомизированно, один и тот же материал показал широкий диапазон по показателю скороспелости. Для стандарта также отмечен предел

колебаний признака скороспелости от 110 до 120 дней (в среднем 115 дней) (табл. 27).

Таблица 27

Скороспелость гибридов хлопчатника

Гибридная комбинация	Число от 50 % всходов до 50 % созревания	
	предел колебаний	среднее
1	2	3
F_2BC_2 Таш-6 x F_1BC_1 108-Ф x F_1 C-6524 x <i>G. sturtii</i>	112-118	114,8
F_2BC_2 C-9070 x F_1BC_1 108-Ф x F_1 C-6524 x <i>G. sturtii</i>	112-122	114,6
F_2BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_1 C-6524 x <i>G. sturtii</i>	107-118	111,7
F_2BC_2 C-9070 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_1 C-6524 x <i>G. sturtii</i>	107-118	111,4
F_2BC_2 C-6524 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_{14} C-6524 x <i>G. sturtii</i>	107-120	112,5
F_3BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_1 C-6524 x <i>G. sturtii</i>	110-114	111,6
F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 C-6524 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_1 C-6524 x <i>G. sturtii</i>	108-118	114
F_1BC_2 Таш-6 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_1 C-6524 x <i>G. sturtii</i>	107-115	112
F_2BC_2 C-6524 x F_2BC_1 (108-Ф x F_{14} Deltapine-80 x <i>G. aridum</i>)	115-120	118
F_2BC_2 C-9070 x F_2BC_1 (108-Ф x F_{14} Deltapine-80 x <i>G. aridum</i>)	110-122	116,2
F_2BC_2 C-9070 x F_2BC_1 (108-Ф x F_{14} Deltapine-80 x <i>G. aridum</i>)	114-128	120,3
F_2BC_2 Таш-6 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_{14} Deltapine-80 x <i>G. aridum</i>	108-120	115,1
F_2BC_2 C-9070 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_{14} Deltapine-80 x <i>G. aridum</i>	107-118	113,3
F_2BC_2 C-6524 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_{14} Deltapine-80 x <i>G. aridum</i>	108-118	113,0
F_2BC_2 C-6524 x F_1BC_2 (F_1BC_1 108-Ф x F_{14} Deltapine-80 x <i>G. aridum</i>)	109-122	115,7
F_3BC_2 (F_1BC_1 108-Ф x F_{14} Deltapine-80 x <i>G. aridum</i>)	108-115	111,7
F_3BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_{14} Deltapine-80 x <i>G. aridum</i>	112-118	114,3
F_4BC_1 108-Ф x F_{14} Deltapine-80 x <i>G. aridum</i>	112-116	114,5

Продолжение табл. 27

1	2	3
F_1BC_4 C-6524 x F_1BC_3 C-6524 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_{14} <i>Deltapine-80</i> x <i>G.aridum</i>	107-114	110,0
F_1BC_4 Б-1 x F_1BC_3 C-6524 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_{14} <i>Deltapine-80</i> x <i>G.aridum</i>	108-114	110,0
F_1BC_4 Там-6 x F_1BC_3 C-6524 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_{14} <i>Deltapine-80</i> x <i>G.aridum</i>	106-112	109,0
F_1BC_4 C-6524 x F_1BC_3 C-6524 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_{14} <i>Deltapine-80</i> x <i>G.aridum</i>	112-120	116,0
F_2BC_2 Там-6 x F_2BC_1 108-Ф x F_{12} (<i>G.hirsutum</i> x <i>G.triphyllum</i>)	112-118	115,0
F_2BC_2 C-9070 x F_2BC_1 108-Ф x F_1 (<i>G.hirsutum</i> x <i>G.triphyllum</i>)	108-114	111,1
F_2BC_2 C-6524 x F_2BC_1 108-Ф x F_{12} (<i>G.hirsutum</i> x <i>G.triphyllum</i>)	109-121	114,0
F_2BC_3 Там-6 x F_2BC_1 108-Ф x F_{12} (<i>G.hirsutum</i> x <i>G.triphyllum</i>)	112-114	113,3
F_2BC_3 C-9070 x F_2BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_{12} (<i>G.hirsutum</i> x <i>G.triphyllum</i>)	107-118	110,6
F_2BC_3 C-6524 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_{12} (<i>G.hirsutum</i> x <i>G.triphyllum</i>)	112-114	113,5
F_4BC_1 108-Ф x F_{12} (<i>G.hirsutum</i> x <i>G.triphyllum</i>)	115-122	118,3
F_1BC_4 Там-6 x F_1BC_3 Там-6 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_{12} (<i>G.hirsutum</i> x <i>G.triphyllum</i>)	108-115	110,0
F_1BC_4 C-6524 x F_1BC_3 Там-6 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_{12} (<i>G.hirsutum</i> x <i>G.triphyllum</i>)	111-114	112,0
F_1BC_4 Б-1 x F_1BC_3 Там-6 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_{12} (<i>G.hirsutum</i> x <i>G.triphyllum</i>)	105-110	107,0
F_2BC_2 C-9070 x F_2BC_1 108-Ф x F_1 (<i>G.hirsutum</i> x <i>G.harknessii</i>)	115-122	118,5
F_2BC_2 C-6524 x F_2BC_1 108-Ф x F_1 (<i>G.hirsutum</i> x <i>G.harknessii</i>)	108-120	112,5
F_2BC_3 C-9070 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_1 (<i>G.hirsutum</i> x <i>G.harknessii</i>)	108-120	114,3

Продолжение табл. 27

1	2	3
F_2BC_3 C-6524 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_1 (<i>G.hirsutum</i> x <i>G.harknessii</i>)	108-110	109,0
F_4BC_1 108-Ф x F_1 (<i>G.hirsutum</i> x <i>G.harknessii</i>)	109-118	113,0
F_1BC_4 C-6524 x F_1BC_3 C-9070 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_1 (<i>G.hirsutum</i> x <i>G.harknessii</i>)	107-110	108,3
F_1BC_3 C-6524 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 C-6524 x F_1 108-Ф x <i>G.raimondii</i>	114-120	117,0
F_1BC_3 175-Ф x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 C-6524 x F_1 108-Ф x <i>G.raimondii</i>	120-128	124,0
F_2BC_3 Там-6 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 C-6524 x F_1 108-Ф x <i>G.raimondii</i>	115-118	116,5
F_1BC_3 C-9070 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 C-6524 x F_1 108-Ф x <i>G.raimondii</i>	114-120	115,8
F_1BC_3 Б-1 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 C-6524 x F_1 108-Ф x <i>G.raimondii</i>	109-113	111,0
F_2BC_2 C-6524 x F_1BC_1 C-6524 x F_1 108-Ф x <i>G.raimondii</i>	110-130	116,9

Многие гибридные популяции в F_2BC_3 показали высокую скороспелость – на некоторых рядках показатель скороспелости был равен 107 дням, в среднем 111-112 дней, что на 3-4 дня превышало контроль – сорт С-6524.

Скороспелые формы также выщеплялись в гибридных популяциях F_2BC_2 и F_2BC_3 с участием *G.aridum* Skov. Растения F_1BC_4 этого амфидиплоида оказались на 6 дней скороспелее стандартного сорта.

Скороспелость беккросспоколений амфидиплоида *G.hirsutum* L. x *G.triphyllum* Horch. была на уровне С-6524. Дальнейшее беккроссирование этого гибрида, например, до BC_4 , приводит к резкому улучшению данного признака. Так, при сложной гибридизации в F_1BC_4 с участием *G.triphyllum* Horch. раскрытие коробочек отмечено на 8 дней раньше контроля.

Аналогичная картина по скороспелости наблюдалась в беккросс-потомствах с участием *G.harknessii* Brand. В данной гибридной популяции в F_1BC_4 уже на 107 день отмечено 50 % созревания, что на 7-8 дней раньше С-6524.

Беккросс-потомство амфидиплоида с участием *G.raimondii* Ulbr. в BC_2 и BC_3 оказалось более позднеспелым, чем С-6524. Однако

имеются гибридные варианты, равные С-6524 по данному признаку. К таким относятся гибриды, где в качестве материнского родителя участвовали сорта С-9070 и Ташкент-6.

В табл. 28 представлены показатели выхода и длины волокна по двум комбинациям скрещивания с участием каждого дикого вида.

Таблица 28

Выход и длина волокна у гибридов хлопчатника

Гибридная комбинация	Выход волокна, %		Длина волокна, мм	
	предел колебаний	среднее	предел колебаний	среднее
F_2BC_2 Таш-6 x F_1BC_1 108-Ф x F_1 С-6524 x <i>G.sturtii</i>	29,8-43,5	35,8	29,8-34,0	31,5
F_2BC_2 С-9070 x F_1BC_2 С-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_1 С-6524 x <i>G.sturtii</i>	33,1-43,6	37,8	31,8-36,2	34,5
F_2BC_2 С-9070 x F_2BC_1 108-Ф x F_{14} <i>Deltapine-80</i> x <i>G.aridum</i>	33,8-39,1	37,2	27,8-34,8	31,6
F_2BC_1 С-6524 x F_1BC_2 (F_1BC_1 108-Ф x F_{14} <i>Deltapine-80</i> x <i>G.aridum</i>) x С-6524	33,1-43,0	39,1	32,0-38,2	34,4
F_2BC_2 Таш-6 x F_1BC_1 108-Ф x F_{12} (<i>G.hirsutum</i> x <i>G.triphyllum</i>)	30,8-41,0	34,2	31,2-36,4	33,8
F_2BC_2 Таш-6 x F_1BC_2 С-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_{12} (<i>G.hirsutum</i> x <i>G.triphyllum</i>)	30,8-39,2	35,8	31,4-33,6	32,9
F_2BC_2 С-6524 x F_2BC_1 108-Ф x F_1 (<i>G.hirsutum</i> x <i>G.harknessii</i>)	31,1-42,7	36,6	29,4-34,4	32,7
F_2BC_2 С-9070 x F_1BC_2 С-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_1 (<i>G.hirsutum</i> x <i>G.harknessii</i>)	30,4-43,4	33,8	30,4-37,2	34,2
F_1 (F_1BC_1 108-Ф x F_1BC_2 <i>G.hirsutum</i> x <i>G.raimondii</i>)	29,0-40,4	33,7	31,2-36,6	33,6
F_1BC_2 Таш-6 x F_1BC_2 <i>G.hirsutum</i> x <i>G.raimondii</i>	30,9-37,8	36,1	29,6-35,4	32,2
F_1BC_2 Б-2 x F_1BC_2 <i>G.hirsutum</i> x <i>G.raimondii</i>	33,8-40,4	36,6	29,0-36,0	31,7
F_2BC_2 С-6524 x F_1BC_1 С-6524 x <i>G.hirsutum</i> x <i>G.raimondii</i>	28,0-39,1	33,8	29,0-36,8	33,1

Как установлено, предел колебаний по выходу волокна у F_2BC_2 и F_2BC_3 (*G.sturtii*) очень велик. При этом значения более близки к

правой стороне предела колебаний, что подтверждается большим количеством индивидуальных отборов с высоким выходом волокна. В F_2BC_3 показатели длины волокна выше, чем у F_2BC_2 .

В BC_3 с участием *G.aridum* Скох. показатели выхода и длины волокна также улучшаются по сравнению с BC_2 . Здесь правая сторона предела колебаний по длине волокна доходит до 38 мм, по выходу волокна – до 43 %.

Таблица 29

Технологические показатели волокна гибридов хлопчатника

Гибридные комбинации	Выход волокна, %	Качество волокна			
		длина, мм	крепость, г	метрический номер	относительная разрывная нагрузка, гс/текс
С-6524	34,6	33,5	4,7	6170	29,0
F_2BC_3 С-6524 x F_1BC_2 С-6524 x F_1BC_1 С-6524 x F_1 108-Ф x <i>G.raimondii</i>	33,7	35,7	4,1	6660	27,2
F_2 (F_2BC_2 С-6524 x F_1BC_1 108-Ф x <i>G.sturtii</i>) x F_1BC_2 (С-6524 x F_1BC_1 (С-6524 x F_1 108-Ф x <i>G.raimondii</i>))	30,2	33,6	4,8	6080	29,2
F_2BC_3 С-4880 x F_1BC_2 С-6524 x F_1BC_1 С-6524 x F_1 108-Ф x <i>G.raimondii</i>	35,0	36,0	4,7	6660	31,3
F_2BC_2 С-6524 x F_1BC_1 С-6524 x F_1 108-Ф x <i>G.raimondii</i>	32,0	33,6	4,5	7000	37,5

F_2BC_3 поколения амфидиплоидов с участием *G.triphyllum* Horsch. по длине и выходу волокна повторили результаты по данным признакам F_2BC_2 . Значения, полученные по выходу волокна, заслуживают внимания и представляют интерес для практической селекции.

В беккросс-потомстве амфидиплоида *G.hirsutum* L. x *G.harknessii* Brand. также встречаются интересные по данному признаку расте-

ния. Так, в F_2BC_3 можно наблюдать индивидумы с выходом волокна 43-44 % и длиной волокна – 37,2 мм.

У беккросс-поколений с участием *G.raimondii* Ulbr. предел колебаний по выходу волокна незначительный, хотя, в отдельных случаях, встречаются индивидуальные отборы с 40 % выходом волокна. По длине волокна гибридные популяции находились в пределах от 29,0 до 36,8 мм.

В данной гибридной комбинации в F_2BC_3 и F_2BC_2 изучались технологические показатели волокна (табл. 29). Полученные результаты показывают, что у BC поколений амфидиплоида с участием *G.raimondii* Ulbr. повышенный показатель метрического номера, характеризующий тонину волокна. Увеличение показателя признака метрического номера волокна у гибридов с участием *G.raimondii* Ulbr. сопровождается повышением относительной разрывной нагрузки на 2-2,3 км, по сравнению с сортом IV типа C-6524. Гибриды также имеют высокую прочность волокна.

Таким образом, из полученных результатов следует, что дикорастущий диплоид *G.raimondii* Ulbr. является донором по качеству волокна, а именно по признакам метрического номера, относительной нагрузке, длине и прочности.

Все вышеуказанные беккросспоколения амфидиплоидов изучались на протяжении ряда лет (до F_{14} - F_{18}) и показывали сильное расщепление по всем признакам. Сотрудниками нашей лаборатории ежегодно проводилось изучение и тщательная браковка по основным хозяйственно-ценным признакам и технологическим свойствам волокна. Стабилизация признаков стала отмечаться лишь к F_{12} - F_{14} поколениям, что подтвердило утверждение ряда исследователей, в частности, Ш.Намазова [135], что, несмотря на появление растений с различным сочетанием хозяйственно-ценных и морфологических признаков в потомстве ранних поколений, у амфидиплоидов (*G.thurberi* Tod. x *G.raimondii* Ulbr.) стабилизация признаков происходит в более старших поколениях (в F_{10-15}).

Так, после установления более стабильных показателей выделены 5 амфидиплоидов с участием *G.sturtii* F. Müell., *G.aridum* Skov., *G.triphyllum* Horch., *G.harknessii* Brand., *G.raimondii* Ulbr., у которых были изучены некоторые хозяйственно-ценные признаки и технологические свойства волокна (табл. 30-31).

Таблица 30
Показатели вилтоустойчивости и скороспелости у беккросс-потомства амфидиплоидов хлопчатника

Гибриды	Количество растений	Заболевание вилтом				Скороспелость, дни	
		в общей степени		в сильной степени		предел колебаний	среднее
		шт	%	шт	%		
Наманган-77 (st)	237	6	2,5	1	0,4	120-122	121
$F_{14}BC_3$ C-9070 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_1 (<i>G.hirsutum</i> x <i>G.harknessii</i>)	164	2	1,2	-	-	108-120	116
$F_{14}BC_3$ C-6524 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x <i>G.raimondii</i>	183	13	7,1	-	-	115-121	118
$F_{10}BC_3$ C-6530 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_1 (<i>G.hirsutum</i> x <i>G.triphyllum</i>)	1465	68	4,6	3	0,2	114-120	117
$F_{15}BC_3$ Ташкент-6 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_1 (C-6524 x <i>G.sturtii</i>)	1526	8	0,5	-	-	101-115	110
$F_{15}BC_3$ C-6524 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_{14} (<i>Deltapine-80</i> x <i>G.aridum</i>)	3056	21	0,7	1	0,03	106-117	112

Проведенные исследования по изучению хозяйственно-ценных признаков и технологических показателей волокна беккросспоколений этих амфидиплоидов, в частности, $F_{14}BC_3$ C-9070 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_1 (*G.hirsutum* x *G.harknessii*); $F_{14}BC_3$ C-6524 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x *G.raimondii*; $F_{10}BC_3$ C-6530 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_1 (*G.hirsutum* x *G.triphyllum*); $F_{15}BC_3$ Ташкент-6 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_1 (108-Ф x *G.sturtii*) и $F_{15}BC_3$ C-6524 x F_1BC_2 C-6524 x F_1BC_1 108-Ф x F_{14} (*Deltapine-80* x *G.aridum*) показали, что по скороспелости все изучаемые гибриды превосходят сорт Наманган-77, взятого в качестве стандарта (см. табл. 30). Наиболее скороспелыми оказались амфидиплоиды с участием *G.sturtii* (110 дней) и *G.aridum* (112 дней), тогда как у контроля этот показатель равен 121 дню. По признаку вилтоустойчивости 3 амфидиплоида с участием *G.sturtii*,

G.aridum, *G.harknessii* превосходят стандартный сорт на 2, 1,8 и 1,3 % соответственно (общей степени). Однако 2 гибридных популяции с участием *G.raimondii* и *G.triphyllum* уступают стандарту на 4,6 и 2,1 %, хотя именно они являются наиболее устойчивыми к вилту и в потомстве также должны давать устойчивые формы. Видимо, здесь дело в том, что в более высоких поколениях некоторые полезные признаки, характерные для дикого вида, подавляются генотипом культурных форм.

Анализ качества волокна показал, что по основным параметрам большинство амфидиплоидов превосходят или находятся на уровне стандартного сорта (см. табл. 31). Так, по выходу, длине, а также разрывной нагрузке волокна наилучший показатель оказался у амфидиплоида с участием *G.harknessii*. Показатель микронейра был лучшим у амфидиплоида $F_{15} BC_3$ Ташкент-6 x $F_1 BC_2$ C-6524 x $F_1 BC_1$ 108-Ф x F_1 (C-6524 x *G.sturtii*).

Отсюда можно сделать вывод, что у полученных нами амфидиплоидов с участием диких форм хлопчатника, не только сохраняется их устойчивость к вилту, но и по другим хозяйственно-ценным признакам отмечено преимущество в сравнении с исходным материалом. Так, у амфидиплоидов длина вегетационного периода и, что особенно важно, качество волокна лучше, чем у стандарта.

Дальнейшее изучение данных беккросс поколений амфидиплоидов позволило выявить наиболее ценные формы, которые были доведены до линейного состояния.

Данные линии оказались урожайнее стандартных сортов на 3,0-8,2 ц/га и более скороспелыми на 7,6-12,4 дней (табл. 32). Из табл. 32 видно, что по урожайности стандартные сорта уступают всем изученным линиям. Высокая урожайность отмечена у линии Б-26 (45,2 ц/га).

Самый короткий вегетационный период (103,3 дней) наблюдался у линии Б-30 (с участием *G.sturtii*). У шести линий (Б-26, Б-84, Б-85, Б-120, Б-162, Б-200) раскрытие коробочек было отмечено раньше 105 дней.

Неплохие результаты получены и по массе одной коробочки. У половины изучаемых линий (Б-30, Б-103, Б-339, Б-162, Б-189, Б-26) наблюдается превосходство над обоими стандартами, пять линий превосходят лишь один стандартный сорт (Наманган-77). В среднем, крупность одной коробочки составила 5,4 г.

Таблица 31
Некоторые технологические показатели волокна беккросс-поколений амфидиплоидов хлопчатника, определенные на НВИ

Сорт, гибрид	Выход волокна, %		Длина волокна				Относительная разрывная нагрузка, гс/текс		Микронейр	
			в дюймах		в мм (код)					
	предел коле- баний	сред- нее	предел колебаний	сред- нее	предел коле- баний	сред- нее	предел коле- баний	сред- нее	предел коле- баний	сред- нее
Наманган-77 (st)	34,4-37,0	35,4	10,11-1,22	1,20	34-36	35	34,9-39,0	37,1	4,1-5,1	4,6
	37,8-42,6	38,9	1,18-1,25	1,22	35-37	36	36,6-41,0	38,9	3,84-4,75	4,36
	36,3-40,8	38,3	1,20-1,26	1,23	36-37	36	29,2-38,9	34,3	3,49-4,29	4,0
	35,8-42,4	38,6	1,06-1,28	1,14	31-38	34	29,3-43,8	34,6	3,04-4,85	4,0
$F_{14} BC_3$ C-6530 x $F_1 BC_2$ C-6524 x $F_1 BC_1$ C-4880 x F_{12} (<i>G.hirsutum</i> x <i>G.triphyllum</i>)	35,6-39,5	37,5	1,15-1,23	1,19	34-36	35	32,3-40,5	36,1	3,20-4,07	3,63
$F_{15} BC_3$ C-6524 x $F_1 BC_2$ C-6524 x $F_1 BC_1$ 108-Ф x F_{14} (<i>Deltapine</i> -80 x <i>G.aridum</i>)	36,0-40,4	38,3	1,07-1,37	1,20	31-41	35	28,8-45,2	37,6	2,99-4,86	3,98

Характеристика линий хлопчатника, полученных на основе межвидовой гибридизации

Сорта, линии	Урожайность, ц/га	Скороспелость, дни	Масса 1-й коровки, г	Масса 1000 шт. семян, г	Выход волокна, %	Длина волокна, дюйм	Микронейр	Удельная разрывная нагрузка, гс/текс
C-6524 - st.	36,1	110,7	5,3	125	35,1	1,12	4,6	30,1
Наманган-77 - st.	37,0	110,5	5,0	115	36,2	1,08	4,7	27,6
Б-30 (F ₁₈ BC ₂ x...x G. sturtii)	42,3	103,3	5,6	112	37,3	1,19	4,5	32,9
Б-83 (F ₁₈ BC ₂ x...x G. sturtii)	40,5	105,9	5,3	119	35,8	1,23	4,2	29,1
Б-84 (F ₁₈ BC ₂ x...x G. sturtii)	41,7	104,9	5,2	123	33,6	1,22	4,2	30,4
Б-85 (F ₁₈ BC ₂ x...x G. aridum)	43,3	104,7	5,2	119	39,6	1,23	4,3	30,4
Б-103 (F ₁₈ BC ₂ x...x G. aridum)	40,0	105,8	5,8	114	37,4	1,20	4,0	32,4
Б-104 (F ₁₈ BC ₂ x...x G. aridum)	42,9	107,2	5,2	123	38,0	1,21	4,1	30,9
Б-339 (F ₁₈ BC ₂ x...x G. aridum)	42,0	105,4	5,5	121	38,2	1,16	4,4	31,6
Б-120 (F ₁₈ BC ₂ x...x G. aridum)	41,1	104,9	5,1	120	37,2	1,19	4,3	28,4
Б-162 (F ₁₈ BC ₂ x...x G. aridum)	43,2	104,6	5,4	126	37,2	1,21	4,6	30,7
Б-200 (F ₁₈ BC ₂ x...x G. aridum)	40,2	104,6	4,9	117	39,5	1,18	4,4	30,0
Б-189 (F ₁₈ BC ₂ x...x G. aridum)	40,7	108,1	5,5	121	36,8	1,18	3,8	30,9
Б-26 (F ₁₈ BC ₂ x...x G. triphyllum)	45,2	104,8	5,7	121	37,1	1,20	4,5	30,0

Примечание: Б-83, Б-84, Б-30 - линии, выделенные из комбинации F₁₈ BC₂ Tаш.- 6 x F₁ BC₂ C-6524 x F₁ BC₁ 108-Ф x F₁ (108-Ф x G. sturtii F. Muehl.); Б-85, Б-103, Б-104, Б-30, Б-120, Б-339, Б-162, Б-200, Б-189 - линии, выделенные из комбинации F₁₈ BC₂ C-6524 x F₁ BC₂ C-6524 x F₁ BC₁ 108-Ф x F₁ (Deltapine-80 x G. aridum Skov); Б-26 - линия, выделенная из комбинации F₁₈ BC₂ C-6530 x F₁ BC₂ C-6524 x F₁ BC₁ C-4880 x G. triphyllum Horeh.

Масса 1000 штук семян у семи линий (Б-26, Б-84, Б-104, Б-339, Б-120, Б-162, Б-189) была выше 120 г, а у некоторых линий доходила до 126 г. У остальных линий показатели по данному признаку расположены в пределах от 112 до 119 г.

Особенно хорошие результаты получены по выходу и качеству волокна. Все изучаемые линии, за исключением Б-84 (33,6 %), оказались высоко выходными, со средним показателем 38 %.

Диапазон варьирования по длине волокна у изучаемых линий составил от 1,18 до 1,23 дюйма, по микронейру - от 3,8 до 4,6, по удельной разрывной нагрузке - от 28,4 до 32,9 гс/текс. Полученные данные соответствуют III-IV типу волокна и вполне отвечают мировым стандартам.

Так как результаты, полученные в течение 3-лет по всем изучаемым признакам, повторили друг друга, можно утверждать, что у беккресс поколений амфидиплоидов, полученных с помощью эмбриокультуры, к F₁₄-F₁₈ наблюдается явная стабилизация признаков.

Исходя из полученных результатов, можно рекомендовать данные линии для практической селекции в качестве исходного материала по скороспелости, урожайности, выходу и длине волокна.

Таким образом, в результате многолетних исследований по изучению хозяйственно-ценных признаков и технологических показателей волокна беккресс-потомства амфидиплоидов, полученных с помощью физиолого-биотехнологических методов, выделены линии хлопчатника, удачно сочетающие урожайность со скороспелостью и хорошими показателями выхода и качества волокна.

ГЛАВА 7

СОЛЕУСТОЙЧИВОСТЬ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ

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 таких сортов необходимы 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. Подобные технологии отстают в своем развитии применительно к такой экономически важной технической культуре, как хлопчатник.

Растения очень часто подвергаются воздействию различных неблагоприятных факторов окружающей среды: высокие и низкие температуры, недостаток влаги, засоление почв и загазованность среды, недостаток или избыток некоторых минеральных веществ и т.д. Этих факторов множество и способы защиты от них многообразны — от физиологических свойств до структурных приспособлений, позволяющих преодолевать их пагубное действие.

Известно, что сельское хозяйство республики длительное время специализировалось на развитии одной отрасли — хлопководстве. Это, в свою очередь, крайне ухудшило мелиоративное состояние поливных земель. Так как основные массивы их находятся в степных и подгорных полустепных зонах, в их почвенно-мелиоративных структурах активизировался процесс засоления.

Среди культурных растений мало солеустойчивых, но, тем не менее, среди них есть культуры и сорта, отличающиеся солеустойчивостью. Из зерновых самой солеустойчивой является культура сорго (*Andropogon sorghum*). Мягкие пшеницы более солеустойчивы, чем твердые. Сравнительно высокой солеустойчивостью

характеризуются сорта ячменя и проса; повышенной солеустойчивостью отличаются хлопчатник, свекла, подсолнечник, томаты, арбузы. Не солеустойчивые культуры — это овес и кукуруза.

Солеустойчивые сорта различных культурных растений обладают низкой проницаемостью плазмы корневых клеток для солей. По типу солеустойчивости они приближаются к соленакапливающим галофитам (морская полынь).

Скопление солей в почве приводит к повышению осмотического давления почвенного раствора, снижая доступность воды для растений. Кроме того, соли подавляют жизнедеятельность растений, как специфические яды. Четко выявляется вредное действие чистых солей в высоких концентрациях, даже таких, как хлористый или сернокислый натрий, считающихся химически вполне нейтральными. Поэтому, нейтрализация ионной ядовитости чистых солей при засолении уравновешенным раствором смеси солей, в котором ядовитое воздействие на плазму одновалентных ионов уравновешено воздействием двухвалентных ионов, приводит к повышению солеустойчивости культурных растений и галофитов. При одностороннем засолении почвы яровая пшеница в опытах А.А.Рихтера резко снижала урожай сухой массы уже при 0,1 н почвенного раствора, а при уравновешенном засолении снижение урожая происходило только при повышении концентрации выше 0,3 н.

Ядовитое действие разных солей неодинаково. Наиболее вредное действие на растения оказывает углекислый натрий, затем хлористый натрий, менее ядовитый сернокислый натрий. Последний наносит вред в 5-6 раз меньше, чем хлористый натрий.

Итак, вред, наносимый засолением почв продуктивности сельскохозяйственных растений, огромен. Поэтому борьба с засолением почв, повышение солеустойчивости хлопчатника и других сельскохозяйственных культур имеет большое народнохозяйственное значение.

В Узбекистане огромные площади, занятые под важнейшими техническими и зерновыми культурами, в той или иной степени засолены.

По сообщению Р.Кузиева [109], засоленные земли в республике составляют 65,9% от общей площади сельхозугодий, из них площади малозасоленных земель — 33,9% (1258,7 тыс.га), средnezасо-

ленных — 19,4% (720,2 тыс.га) и сильнозасоленных — 12,6% (467,5 тыс.га). Площади засоленных почв в Андижанской, Наманганской, Ташкентской, Самаркандской областях составляют 26–42%; в Сырдарьинской, Сурхандарьинской, Кашкадарьинской, Хорезмской, Бухарской областях и Республике Каракалпакстан площади с различной степенью засоления занимают 86–96% орошаемых земель, причем на средне- и сильнозасоленные приходится 44–64%.

Таким образом, в результате освоения засоленных и мелиоративно-неблагополучных почв площадь засоленных земель увеличилась на 0,8 млн. га и в общем объеме по республике составляет около 2 млн. га. Из них 0,8 млн. га приходится на почвы средней и сильной степени засоления.

Засоление земель снижает численность и активность полезных микроорганизмов (нитрификаторов, аммонификаторов), имеющих непосредственное отношение к плодородию почв, способствует интенсификации процессов денитрификации и увеличивает потери азота через улетучивание в виде газа. Засоление почв приводит к тому, что нарушается эволюционно сложившаяся избирательная проницаемость клеток для различных веществ и, как следствие, усиливается поступление в хлопчатник одних элементов из внешней среды (натрия, хлора, алюминия, железа, кремния, фосфора и др.) и уменьшается поступление других (калия, кальция, и т.д.), повышается концентрация и осмотическое давление клеточного сока, снижается поглощение воды корнями, изменяется ультра-тонкое строение и функциональное состояние микроструктур (митохондрий, аппарата Гольджи, эндоплазматического ретикула, лейкопластов), скорость и направление ферментативных процессов обмена, индуцируется распад высокомолекулярных биологически особо важных соединений (например, разрывается связь между ДНК и гистонами), резко подавляется так называемый гликолитический (или гексозодифосфатный) цикл и усиливается пентозофосфатный (или гексозомонофосфатный) путь окисления органических субстратов, снижается энергетическая эффективность дыхания, вызывается накопление в тканях различных токсичных продуктов жизнедеятельности организма (минеральных, органических, аминокислот, аммиака и т.д.), а также целому ряду иного рода отклонений в клетках [39, 171, 173].

Внешние признаки токсического действия солей в раннем воз-

расте проявляются в покраснении и сильном изгибе корешков проростков, затем — в постепенном их отмирании и, следовательно, изреженности хлопковых полей. У выживших растений засоление приводит к нарушению состояния хлоропластов, изменению количества и соотношения хлорофиллов «а» и «б», качества продуктов фотосинтеза, снижению интенсивности этого процесса, биосинтеза белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов и жиров [132]. Все это приводит к затягиванию вегетационного периода, уменьшает вес и число коробочек, задерживает их раскрытие. По данным Узбекской Республиканской землеустроительной экспедиции [цит. по 39], избыточное содержание солей в почвах, находящихся в сельскохозяйственном обороте, снижает их производительную способность в 1,5–2,5 раза и более. Пока же основными средствами борьбы с засолением являются ирригационно-мелиоративные мероприятия, промывки земель, зимние и ранневесенние поливы, которые, однако, могут вызвать вторичное засоление полей. И эта проблема с давних времен привлекает внимание исследователей различного профиля и практических специалистов сельскохозяйственного производства.

По мнению Ю.И.Широковой и А.Н.Морозова [192], основные черты климата Средней Азии, формирующие режим и тенденции соленакопления в почвах и подстилающих отложениях — обилие тепла, дефицит влаги, продолжительное жаркое и сухое лето, короткая и относительно тёплая зима. Радиационный индекс сухости К, характеризующий связь энергетического, водного и солевого режимов, и отражающий совокупность основных средообразующих факторов, для рассматриваемой территории колеблется в пределах 2,5–12. Коэффициент аридности — $K_a < 0,12$ –0,3, коэффициент континентальности — $K_k = 220$ –290. Эти показатели в условиях гидроморфного режима являются причиной засоления почв.

По данным Р.Хабиева [185], более 8 % орошаемых земель Узбекистана являются мелиоративно-неблагополучными с высоким уровнем засоленности почв и залегания грунтовых вод. Из-за неудовлетворительного мелиоративного состояния земель около 330 тысяч гектаров вообще теперь не используются в сельскохозяйственном обороте. За последние семь лет средний балл бонитета (показатель, по которому оценивается качественное состояние орошаемых земель) снизился до 55 баллов. Наиболее критическое

положение в Каракалпакстане, Хорезмской, Бухарской, Сырдарьинской, Ферганской и Ташкентской областях.

В 2007 г. правительство республики утвердило Государственную программу мелиоративного улучшения орошаемых земель, предусматривающую проведение широкого комплекса работ по строительству, реконструкции и ремонту мелиоративных объектов, обновление парка мелиоративной техники. Программа рассчитана на 2008-2012 годы. Правительство решило осуществить грандиозный объем работ по строительству и реконструкции магистральных коллекторов общей протяженностью свыше 3,5 тысяч километров и более одной тысячи мелиоративных скважин. Вторая цель – восстановить дренажные сети протяженностью свыше 7,6 тысяч километров. На эти цели выделены средства, из которых значительная часть пойдет на восстановление поливных каналов, оснащение современной техникой водохозяйственных организаций. В списке главных кредиторов – Шанхайская организация сотрудничества (ШОС), правительство КНР и Азиатский банк развития [185].

В начале 2008 года Президент Республики Узбекистан утвердил программу мер по выполнению приоритетных направлений социально-экономического развития страны на год. Среди них одной из важных задач является обеспечение мелиоративного улучшения и повышения плодородия орошаемых земель. По словам И.А.Каримова, «сверхважная задача по мелиоративному улучшению и повышению плодородия орошаемых земель должна стать основным нашим приоритетом на 2008 и последующие годы» [185].

Для спасения орошаемых земель Республики Всемирный банк, ШОС, Исламский банк развития и правительство Китая выделили на протяжении последних лет несколько льготных кредитов. Деньги в объеме 70 млн. долларов были направлены на улучшение мелиоративного состояния земель центральной части Ферганской долины, некоторых районов Каракалпакстана и Сырдарьинской области.

В свете этих данных, повышение урожайности растений на засоленных почвах и освоение засоленных земель представляют собой первостепенную задачу, а исследования в области солеустойчивости растений приобретают особо актуальное значение. Резкое снижение урожайности и ухудшение качества продукции культурных растений, вызванное засолением, приводит к значительным поте-

рям сельскохозяйственной продукции и приносит колоссальные убытки народному хозяйству.

В ряде фундаментальных работ заложены основы знаний о солеустойчивости растений [39, 74, 102, 172, 179, 183]. Большинство этих исследований посвящено выяснению качественной стороны этого вопроса, а также изучению ряда генетических, биохимических, физиологических, экологических и агрономических аспектов проблемы солеустойчивости.

Выявлены факторы, влияющие на солеустойчивость растений, и некоторые механизмы физиологической и биохимической адаптации к солевому стрессу в онтогенезе. Наряду с этим в данных исследованиях обращалось недостаточно внимания на количественную сторону вопроса. Кроме того, в подавляющем большинстве экспериментов привязка результатов производилась к внешней концентрации раствора. Поскольку накопление солей зависит не только от концентрации внешнего раствора, но и от вида растений и типа ткани, то для понимания механизма солевого обмена и ионоустойчивости клетки необходимо, прежде всего, знать концентрацию ионов в тканях и их биохимический состав. Конечно, полное определение минерального и биохимического состава – задача весьма трудоемкая. Поэтому исследователи стремились достичь такого уровня, который позволит связать в единое целое внешнюю среду – растение – биохимическую и ионную направленность процесса.

Как видно из краткого обзора литературы, несмотря на то, что исследования по солеустойчивости растений имеют давнюю историю, проблема эта на сегодняшний день имеет немало нерешенных вопросов и по-прежнему привлекает к себе внимание исследователей самого широкого профиля. Внимание это обусловлено тем, что, с одной стороны, в отдельных регионах засоленные почвы занимают значительные территории, с другой – тем, что при искусственном орошении, во многих случаях используются воды с различной степенью минерализации и засоления.

Для практического земледелия большое значение приобретают способы оценки исходного материала на солеустойчивость, так как использование видов сельскохозяйственных культур, устойчивых к различным типам засоления, в значительной степени повышает отдачу каждого гектара используемой пашни.

Существующие сорта и коллекционные образцы хлопчатника способны выдерживать засоление максимум до 1,0 %. Несмотря на многочисленные исследования в области изучения солеустойчивости, до сих пор нет растений среди культурных форм хлопчатника, способных быть донорами высокой устойчивости к засолению. Одной из принципиальных проблем в этом плане является создание исходных форм и на их основе – выведение солеустойчивых сортов хлопчатника, обладающих комплексом полезных селекционных признаков. Второй – проведение агротехнических мероприятий. Необходимо также продолжать исследования по выяснению механизмов ионного гомеостаза клеток тканей.

Изучение механизмов солеустойчивости и разработка способов повышения устойчивости хлопчатника к засолению, несомненно – требование времени, так как в связи с этим открываются перспективы расширения ареала возделывания хлопчатника, повышения его урожайности, сохранения на оптимальном уровне технологических свойств волокна и качества семян.

Хлопчатник по солеустойчивости является факультативно-галофитом и может переносить достаточно высокое содержание (до 0,1 %) солей в почве [140]. Однако степень его устойчивости к этому фактору резко меняется в зависимости от физико-химических свойств почв, качественного и количественного состава и соотношения солей, минеральных элементов питания в них, уровня воды, а также от условий выращивания, физиологического состояния растений, особенно от биологических характеристик (генотипа) сорта, видов и т.д. Хлопчатник наиболее чувствителен к карбонатно-хлоридному и относительно устойчив к сульфатному засолению [39].

Токсическое действие ионов на растения проявляется в раннем возрасте проростков, затем его солеустойчивость возрастает в фазу бутонизации и цветения, достигая апогея в период массового образования коробочек [12, 139]. При этом показано, что разные сорта и формы хлопчатника на одном и том же этапе онтогенетического развития не в одинаковой степени реагируют на засоление. По степени реакции растений на воздействие солей исследователи [173] делят их на солестойкие, солевыносливые и соленевыносливые. В естественных условиях засоления (в период прорастания семян) сорта тонковолокнистого хлопчатника, по сравнению со среднево-

локнистыми, оказались более устойчивыми. Наименьшей солеустойчивостью отличались сорта вида *G. arboreum* L. Сорт Турфанская гуза, относящийся к виду *G. herbaceum* L., оказался наиболее выносливым к вышесредней засоленности почвы [36]. Дикорастущие виды хлопчатника *G. klotzschianum* Anderss., *G. davidsonii* Kell. отличаются солеустойчивостью [10, 124]. Следует отметить, что не всякая дикая форма является устойчивой к засолению.

Как показывают результаты полевых наблюдений, не только разные формы, сорта, но и отдельные индивидуумы одного и того же сорта хлопчатника проявляют неодинаковую солевыносливость [162]. На засоленных почвах нередко встречаются высокоурожайные растения. Поэтому было предложено применять внутривидовые скрещивания для получения форм с повышенной устойчивостью к засолению почв и большой плодовитостью [173], а также проводить отбор семенного материала хлопчатника на засоленных почвах [58].

Солеустойчивость, как и другие виды устойчивости, является потенциальной способностью растения, проявляющейся при соответствующих условиях среды в процессе его развития. Многими исследователями отмечалось повышение солеустойчивости хлопчатника и при предпосевной обработке набухших семян в растворах солей в течение нескольких часов [74] или при постепенном повышении засоленности почвы, а также путем выращивания его в течение ряда генераций непосредственно на засоленных полях. Растения, полученные таким способом, отличались пониженной проникаемостью корневых клеток для солей и меньше страдали от избытка солей в почве. Установление потенциальной способности хлопчатника к повышению своей солевыносливости при возделывании на засоленных землях имеет большое значение для семеноводства. Этот факт указывает, что для получения высоких урожаев хлопчатника на засоленных полях посевные семена нужно заготавливать в таких же условиях, а не привозить их из других регионов, выращенных на обычных незасоленных почвах.

Вышеизложенное свидетельствует о том, что в изучении физиологии солеустойчивости хлопчатника достигнуты определенные успехи. Вместе с тем физиологические особенности, биохимическая природа, а также биофизические аспекты солеустойчивости хлопчатника еще полностью не раскрыты как по отношению к

отдельным слоям, так и к их различным комбинациям, встречающимся в почве. Не изучен вопрос о генетических основах солеустойчивости, закономерностях наследования и проявления ее в онтогенезе, пока нет каких-либо радикальных способов улучшения этого свойства, применяемых в производстве. Это обстоятельство настоятельно требует проведения всесторонних, углубленных исследований по генетике, биохимии, биофизике и физиологии солевыносливости хлопчатника и сопутствующих культур. Полностью не выяснены эффективность различных доз и форм минеральных удобрений и значение органического вещества — одного из главных рычагов плодородия почвы — в усвоении растениями элементов питания на засоленных землях. Для понимания истинной картины солеустойчивости хлопчатника и разработки путей ее повышения важно также изучать влияние на нее и других макро-, микро- и ультрамикроэлементов и комплексных удобрений, водного режима, микрофлоры, различных схем севооборота и степени рыхления пахотного и подпахотного слоев почв при разнокачественном засолении. Однако существует и другое, альтернативное, решение данной проблемы — создание новых сортов сельскохозяйственных культур, способных давать высокий и качественный урожай с единицы площади методами генной инженерии. Наряду с физиологическими и агротехническими методами, одним из центральных (главных) подходов к решению проблемы солеустойчивости данной культуры является выведение солевыносливых сортов путем гибридизации с привлечением для этой цели, прежде всего, уже известных диких видов (*G.klotzschianum* Anderss., *G.davidsonii* Kell., *G.triphyllum* Hochr. и др.), солевыносливых форм, которых, видимо, немало среди диких и полудиких сородичей хлопчатника. Однако, несмотря на чрезвычайную важность проблемы, к сожалению, работ по изучению солеустойчивости диких форм и выведению устойчивых к засолению сортов проводится крайне недостаточно. Поэтому настало время развернуть и расширить исследования как в направлении изыскания солеустойчивых форм среди дикого, полудикого и культурного разнообразия хлопчатника, так и создания солевыносливых урожайных сортов, сочетающих комплекс полезных селекционных признаков с высоким качеством волокна, отвечающим требованиям мирового рынка и внедрения их в фермерские хозяйства республики.

Таким образом, повышение урожайности сельскохозяйственных культур и качества получаемой продукции на мелиоративно-неблагополучных почвах с применением агротехнических методов связано с очень большими затратами. Данная проблема волнует не только ученых нашей республики. В частности, сенсационное открытие сделали израильские исследователи из Института эволюции Хайфского университета: они сумели выделить ген, ответственный за устойчивость растения к засоленности почвы.

Чтобы найти ген, ученые занялись исследованием грибковой флоры Мертвого моря, сообщает IsraelInfo, ссылаясь на Israel21c. В сверхсоленой воде Мертвого моря умудряются выживать 77 видов грибов, причем некоторые из них прекрасно размножились в этой, казалось бы, непригодной для жизни среде и даже достигли морского дна на глубине 300 м.

Ученые заинтересовались генетической структурой этих организмов и в конечном итоге сумели выделить ген, определяющий повышенную резистентность к соленой среде. Неожиданно оказалось, что тот же ген дает и высокую устойчивость к резким перепадам температур — ученые обнаружили это, внедрив его в генетическую структуру обычных дрожжей.

По данным Эвитара Нево, это открытие в перспективе может значительно расширить площадь пригодных для растениеводства угодий.

Сейчас площадь таких земель на планете составляет около 17 миллионов квадратных километров — чуть более 20 % земной суши. При этом каждый год около 10 миллионов гектаров земли теряют пригодность для растениеводства.

Современные методы повышения плодородия почв и полива привели к засолению огромных площадей сельхозугодий во всем мире, и особенно в жарких и засушливых регионах.

Достижение израильских ученых позволит методами генной инженерии вывести сорта растений, способных расти на засоленных почвах.

Перед селекционерами республики стоит глобальная задача по усилению работ в направлении создания сортов хлопчатника с комплексной устойчивостью к высокому содержанию солей в почве. В последнее время возникновение новых направлений в биологической практике, в частности, сельскохозяйственной био-

технологии, дало возможность создания сортов, устойчивых к засолению у многих культурных растений, которые были получены, в основном, путем клеточной селекции.

Клеточная селекция является как бы развитием мутационной селекции, но реализуется на уровне единичных клеток с использованием техники *in vitro*, что придаёт ей, с одной стороны, более широкие возможности, а с другой – создаёт значительные трудности из-за необходимости регенерации из отдельных клеток полноценных растений [60, 166, 181, 182]. Преимущество клеточной селекции перед традиционными методами состоит в отсутствии сезонности в работе, возможности использования миллионов клеток при отборе, направленности селекции путём применения селективных сред и выполнении работ в лабораторных условиях [190].

Вместе с тем, следует отметить, что биотехнологические исследования на хлопчатнике сами по себе очень сложны из-за трудности регенерации растений из клеток *in vitro*. Прежде чем изучать селекционный процесс на клетках хлопчатника, необходимо исследование их морфобиологического состояния на засоленной среде и в условиях *in vitro*, что до сих пор хорошо не изучено.

В этой связи большое значение имеют сравнительные исследования на модельных системах, которыми являются каллусные и суспензионные культуры. Это позволяет раскрыть некоторые аспекты влияния засоления на жизнедеятельность растений, уточнить возможности применения культуры тканей и клеток для селекционно-генетических исследований в создании солеустойчивых растений и оценки коллекционного материала на солеустойчивость в лабораторных условиях.

ГЛАВА 8 КАЛЛУСОГЕНЕЗ И СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОИДОГЕНЕЗ У ХЛОПЧАТНИКА

Подавляющее большинство биотехнологий для растений основано на использовании культур тканей, клеток и протопластов. Ценность данной экспериментальной системы определяется её большими потенциальными возможностями в решении практических и фундаментальных проблем биологии и создании новых эффективных биотехнологий.

В последние десятилетия интенсивное развитие методов культуры *in vitro* клеток, тканей и органов растений привело к тому, что биотехнология растений значительно расширила границы своего применения в адаптивной селекции. В то же время далеким от окончательного решения остается вопрос о биотехнологически оптимальном эксплантате и совершенствовании способов реализации его морфогенетического потенциала с целью получения зрелых растений-регенерантов с качественными семенами.

Индукция каллусогенеза у растений во многом зависит от типа происхождения эксплантата, его возраста, состава питательной среды и многих других факторов [59]. Такого же мнения придерживается и заведующий кафедрой и отделом сельскохозяйственной биотехнологии МСХА академик РАСХН и АН Республики Беларусь В.С.Шевелуха [191]. Исследования, проведенные им и его сотрудниками, показали, что у так называемых «трудных» для биоинженерных работ культур, какими являются роды *Triticum* и *Helianthus*, сильно выражена зависимость указанных выше показателей от генотипа, состава и концентрации ингредиентов селективной среды.

В своих исследованиях на хлопчатнике N.L.Trolinder и J.R.Goodin [331 - 333] установили, что образование эмбрионидов из каллусной массы зависит, в основном, от генотипа и, что наиболее высокой эмбриогенной способностью отличаются сорта американской селекции *Coker*.

Н.А.Вечернина и др. [68], изучая процессы каллусогенеза и регенерационной способности изолированных тканей и органов сорта Ермак вида *Allium cepa* L., показали, что эти процессы зависят от регуляторов роста, морфотипа развивающегося каллуса и от длительности культивирования.

Процессы регенерации в культуре каллуса из пыльников двух гибридных генотипов льна масличного на питательных средах №6 и LMA-1 при различных концентрациях 6-бензиламинопурина (БАП) изучал А.И. Сорока [168]. В результате проведенных исследований было показано, что рост и развитие каллуса лучше происходят при концентрации в среде БАП 2 мг/л по сравнению с 4 и 6 мг/л.

Исследователь И.В. Орлова со своими коллегами [141] разработали эффективную систему регенерации *R. carthamoides* из листовых эксплантов. Ими получены трансгенные растения *R. carthamoides*, содержащие *rol C* – ген *35S CaMV*- промотором.

Изучая развитие волокна хлопчатника, С.А. Beasley с сотрудниками [217-219] развили систему культуры семян. Использование разработанной ими системы вносит свой вклад в понимание физиологии развития волокна. Система культуры семян продолжает быть важным аспектом текущих исследований по физиологии и молекулярной биологии волокна.

О.Я. Весманова и др. [66] изучали влияние различного углеводного питания, светового и температурного режимов на накопление биомассы каллусной культуры *G. arboreum* L. Показано, что ткань хлопчатника использует для развития в основном глюкозу. Оптимальная концентрация глюкозы при этом 3 % и более. Ими установлено, что при использовании сахаров, не утилизирующихся в глюкopiранозных путях, нормального прироста тканевой массы не происходит. Повышение же температуры и отсутствие освещения угнетают рост ткани, особенно в начальный период культивирования. Кратковременное воздействие низких температур (0 и -4°C) стимулирует прирост биомассы.

В работе Е.В. Быковой и др. [64] показано, что в каллусных тканях, образующихся из гипокотилей диплоидных и тетраплоидных видов хлопчатника в длительно пассируемых культурах, наблюдаются значительные изменения в кариотипе клеток. В процессе исследований авторы сделали вывод, что для использования каллусных тканей хлопчатника в качестве модельных объектов следует брать ткани 1-х пассажей, в клетках которых наблюдается относительная стабильность числа хромосом, а для работ, в которых нужен широкий спектр изменчивости числа хромосом, необходимо использовать ткани более поздних пассажей. Подобные цито-

логические исследования на каллусных тканях хлопчатника вида *G. arboreum* L. проводили О.Я. Весманова и др. [66].

В наших исследованиях для получения каллусной массы также использовался гипокотиль, который разрезали на кусочки длиной 5-8 мм, начиная от корневой шейки до эпикотиллярной части растения. Для всех генотипов хлопчатника были применены одинаковые условия получения эксплантов.

В качестве объекта исследований использованы сорта отечественной селекции С-4727 и С-6524 и сорт американской селекции Coker-312. Семена этого сорта получены из Америки и после карантинного испытания высевались на опытных участках УзНИИССХ. Растения выращивали по общепринятой методике, цветки для самоопыления изолировали пакетиками накануне цветения. Семена с самоопыленных коробочек I и II-года собирали в отдельные мешочки.

Для получения стерильных проростков семена стерилизовали в концентрированной серной кислоте в течение 1-3 мин., затем трижды промывали в стерильной дистиллированной воде. Инструменты стерилизовали в автоклаве в течение 30 мин. при давлении 0,8-1,0 кг/см³. Затем семена высевали в ламинар боксе в колбы, объемом 250 мл на среду, состоящую из воды + 2 % сахарозы + агар и проращивали в факторостатном помещении с 16-часовым освещением при температуре + 26 ± 2°C и относительной влажности воздуха 70 %. Первичные культуры каллуса получали из тканей гипокотилей.

Для получения твердой питательной среды добавляли агар, полученный из некоторых морских водорослей. Использованный нами бактериальный агар «Дифко» содержит значительно меньше примесей; не требует продолжительной промывки водой и, по сравнению с обычным агаром, даёт лучшие результаты.

Через 6-7 дней после достижения проростками высоты 10-12 см их в асептических условиях вынимали из колб и гипокотиллярную часть разрезали ножницами на сегменты длиной 5-8 мм, которые переносили в 150 мл колбы на агаризованную среду.

В качестве основной среды для каллусообразования использовали следующую искусственную питательную среду Мурасиге и Скуга (*Murashige, Scoog*, 1962):

Макроэлементы, мг/л

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	440
KH_2PO_4	170
KNO_3	1900
NH_4NO_3	1650
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	370
$\text{FeNa} \cdot \text{ЭДТА}$	36,7

Микроэлементы, мг/л

$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,025
KI	0,83
H_3BO_3	6,2
$\text{MgSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	22,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	8,6

Витамины по B-5 Gamborg, мг/л

Никотиновая кислота	1,0
Тиамин-HCl	10,0
Пиридоксин-HCl	1,0
Миоинозит	100,0
Глюкоза	30 000
РН	5,6

Использовали витамины и фитогормоны фирмы «Serva» (Германия). Питательную среду автоклавируют в течение 30 мин. при давлении 0,8-1,0 кг/см². Культивирование проводят в факторостатном помещении при температуре +26±2°C, освещении – 3000-4000 люкс, относительной влажности воздуха – 70 %.

Для индукции каллусогенеза у хлопчатника мы использовали питательные среды MS и LS, ранее предложенные рядом исследователей [7, 64, 105, 118, 332, 333], дополненные витаминами B-5 Gamborg. Наряду с известными экзогенными фитогормонами изучали дефолиант Дропп (5,7 N-фенил-N-(1,2,3-тиадиазолил-5)-мочевины) в качестве цитокинина, предложенный С.В.Лев и др. [115, 117, 118].

Испытывали 3 концентрации Дропп 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸ в сочетании с

2,4-Д (0,1 мг/л) и НУК (0,1 мг/л, 1,0 мг/л). Исследования показали, что присутствие цитокинина Дропп как в отдельности, так и в сочетании с ауксинами в питательной среде даёт хорошие результаты по индукции каллусогенеза из гипокотилиа отечественных сортов и сорта американской селекции. В присутствии Дропп из гипокотилиа образуются рыхлые, мясистые, водянистые каллусные клетки бледно-зелёного цвета.

При первом субкультивировании на агаризованной среде каллусные клетки очень интенсивно растут в течение длительного времени культивирования (30-40 дней).

Второе субкультивирование проводили на среде MS в трёх вариантах Дропп при повышении концентрации тиамин до 0,4 мг/л. Во всех случаях, особенно при концентрации Дропп 10⁻⁸ каллусные клетки продолжали интенсивно расти, имея мясистую водянистую структуру, смазывающуюся при пересадке.

Начиная со второго субкультивирования до 6 пассажа, в этом варианте питательной среды образование эмбрионидных структур не наблюдалось. Данные наших экспериментов на выбранных нами сортах полностью совпадали с данными экспериментов ученых Узбекистана, ранее проводимых на других сортах и видах хлопчатника.

Дальнейшие исследования продолжали на среде MS с фитогормонами α-НУК и кинетин, предложенной N.J.Gawel [242]. Для субкультивирования у всех исследуемых сортов индукцию каллусогенеза получали при использовании 0,1 мг/л 2,4-Д, а дальнейшее субкультивирование каллусных клеток проводили на среде MS с НУК и кинетином, начиная от 0,1 мг/л до 2 мг/л. Исследования показали, что при низких концентрациях α-НУК и кинетина (0,1 : 0,1 мг/л) каллусные клетки развиваются очень медленно. При повышении концентрации кинетина до 1 мг/л и при 0,1 мг/л НУК каллусные клетки становятся более твёрдыми, сверху образуется белый налёт. При повышении же концентрации α-НУК и постоянной концентрации кинетина (0,1 мг/л) каллусные клетки начинают интенсивно расти, становятся рыхлыми, мягкими, имеют бледно-зелёный цвет. Среди изученных 24-х вариантов сочетания фитогормонов более оптимальным для интенсивного роста каллусных клеток оказался вариант фитогормонов 2 мг/л НУК и 1 мг/л кинетин. Такая же концентрация этих фитогормонов была использована в исследованиях R.C.Shoemaker et.al. [313], где он на сортах

американской селекции *Coker-201*, *Coker-310*, *Coker-312*, *Coker-315* получил начало соматического эмбриондогенеза.

Для проведения наших исследований использовали схему, предложенную R.C.Shoeemaker [312], которая состоит из нескольких этапов:

- 1) индукции каллусогенеза;
- 2) стабилизации каллусных клеток;
- 3) трёх - четырёхкратной субкультуры на одной среде с коротким интервалом;
- 4) эмбриондогенеза.

Для изучения схемы R.C.Shoeemaker мы использовали ту же серию сортов *Coker*. Здесь необходимо отметить, что так как семена сортов *Coker* получены из коллекции различных стран, то трудно говорить о генотипической однородности сортов, используемых нами и сортов, изученных R.C.Shoeemaker.

Результаты исследований показали, что из гипокотилей всех сортов интенсивно индуцируются каллусные клетки бледно-коричневого цвета, имеющие твёрдую структуру, не разрушающиеся при субкультивировании, а из семядольных листьев каллусные клетки индуцируются очень медленно.

Первую субкультуру каллусных клеток, полученных из гипокотилей, проводили на среде *MS* с НУК (2 мг/л) и кинетином (1 мг/л) по вышеуказанной схеме. На этой среде каждые 10-12 дней трижды пересаживали каллусные клетки всех исследуемых сортов *Coker*. Затем, также по схеме, продолжали субкультивирование на следующих средах:

1. *MS* с НУК (2 мг/л) и кинетином (1 мг/л), при замене глюкозы на сахарозу (3 %).
2. *MS* с 2-изопентиладенином (1 мг/л) и НУК (1 мг/л).
3. *LS* с KNO_3 (3,8 мг/л), кинетином (0,5 мг/л) и НУК (1 мг/л).

При субкультивировании каллусных клеток на 1-й среде клетки за счёт присутствия сахарозы замедляли свой рост. В основном каллусные клетки приобретали бледно-жёлтый цвет, имели мягкую смазывающуюся структуру. При дальнейшем субкультивировании на такой же среде их цвет и консистенция не менялись, формирование каких-нибудь эмбриоподобных структур не наблюдалось.

Первоначальные каллусные клетки параллельно субкультивировали на 2-й среде с 2-изопентиладенином. При низких концент-

рациях 2-изопентиладенина и постоянных концентрациях НУК (1 мг/л) каллусные клетки росли медленно. Повышение же концентрации 2-изопентиладенина в среде *MS* приводило к формированию комкообразных каллусных клеток зелёного цвета. Особенно хороший рост каллусных клеток наблюдали при концентрации 2-изопентиладенина 8-10 мг/л.

При субкультивировании на 3-й среде, где концентрация KNO_3 была повышена в 2 раза, каллусные клетки сильно замедляли свой рост и при втором субкультивировании на этой же среде почти у всех исследуемых сортов наблюдался их некроз.

Среди изученных 3-х вариантов сред наиболее подходящей для индукции каллусогенеза оказалась среда *MS* с 2 мг/л НУК и 1 мг/л кинетина. В качестве источника углеводного питания продолжали применять глюкозу. В связи с тем, что каллусные клетки хорошо росли на среде *MS* с НУК и кинетином, то для получения соматического эмбриондогенеза изучали большой размах концентрации этих фитогормонов – от 0,001 до 2,0 мг/л (табл. 33).

Таблица 33
Варианты фитогормонов в питательной среде *MS*
с витаминами В-5 *Gamborg*.

Вариант	НУК, мг/л	Кинетин, мг/л
1	2,0	1,0
2	2,0	0,1
3	2,0	0,01
4	2,0	0,001
5	1,0	0,1
6	1,0	0,01
7	1,0	0,001
8	0,1	2,0
9	0,01	2,0
10	0,001	2,0
11	0,1	1,0
12	0,01	1,0
13	0,001	1,0

Субкультивирование сортов *Coker*, С-4727 и С-6524 проводили на вышеуказанных средах. Результаты исследований показали,

что во всех вариантах каллусные клетки изучаемых сортов росли практически одинаково. Во 2-4 вариантах каллусные клетки развивались медленно, имели мягкую структуру зелёного цвета. В 5-7 вариантах клетки росли интенсивнее, приобретая твёрдую структуру с образованием на каллусах белых нитевидных корней. В 8-10 вариантах формировались твёрдые каллусные клетки с белым налётом на поверхности. В 11-13 вариантах сред клетки росли почти аналогично 8-10 вариантам. Анализ проведённых исследований показывает, что на среде *MS* хорошая индукция каллусных клеток и интенсивный рост их при субкультивировании наблюдается с применением 2 мг/л НУК и 1 мг/л кинетина. Понижение концентрации этих фитогормонов в среде приводит к замедлению роста каллусных клеток. При многократном субкультивировании клеток изучаемых сортов на отдельных этапах у С-4727 и С-6524 наблюдали формирование зелёных глобулярноподобных структур. Однако дальнейшего развития получить не удалось и они часто распались на неорганизованные каллусные клетки. Таким образом, на этих средах у сортов отечественной селекции и у сорта *Coker-312* нам не удалось получить соматического эмбриондогенеза.

Морфогенез растений как формообразовательный процесс различных структур, совершающийся на различных уровнях [54], вызывает большой интерес. Одно из перспективных направлений исследований — изучение морфогенеза в каллусе в контролируемых условиях *in vitro*. Каллус как гетерогенная интегрированная структура (система), образующаяся в результате пролиферации клеток на поверхности отдельных структур растительного организма, формирующаяся, как правило, из исходно разных клеток генеративных или вегетативных органов [54], представляет собой идеальную модельную систему для изучения как общих закономерностей, так и особенностей морфогенеза растений *in vitro*.

В 1986-1990-е годы появилось сообщение американских учёных по соматическому эмбриондогенезу у сортов вида *G.hirsutum* [242, 313, 314, 331]. Авторам удалось получить регенерацию у сортов американской селекции *Coker* и *Deltapain*. Среди этих сортов наиболее высокой регенерационной способностью отличается сорт *Coker-312*. По мнению R.C.Shoemaker, регенерация у хлопчатника сильно зависит от генотипа либо большого количества вариантов питательных сред.

Регенерация — явление восстановления целого организма из его части. При культивировании регенерация может происходить разными путями: прямая регенерация из культур меристемы, верхушечных побегов, пазушных почек и узлов, причем дифференциация управляется фитогормонами, и косвенная, с промежуточной стадией каллуса. В последнем случае также возможны два пути: при органогенезе определенными концентрациями и соотношениями фитогормонов вызывают образование придаточных побегов и корней; при соматическом эмбриогенезе в каллусе образуются зародыши, из которых вырастает растение, затем переносимое в грунт.

С использованием каллусных клеток сорта *Coker-312* учеными фирмы *Monsanto* (США) был создан трансгенный хлопчатник, обладающий устойчивостью к чешуекрылым насекомым. В связи с этим, сотрудниками института Генетики и экспериментальной биологии растений АН РУз через московских коллег от доктора N.Trolinder были получены семена именно этого же генотипа. Часть семян использовали в лаборатории генной и клеточной инженерии института Биорганической химии АН РУз, а часть семян в лаборатории биотехнологии хлопчатника УзНИИССХ.

Для получения соматического эмбриондогенеза у сорта *Coker-312* использовали схему N.Trolinder в несколько измененной форме. N.Trolinder предлагает после индукции каллусных клеток культивировать их в суспензионной среде с короткими интервалами. Эту схему мы изменили на более длительные интервалы культивирования. После получения стерильных проростков сорта *Coker-312* гипокотиллярную часть разрезали на сегменты длиной 6-8 мм и высевали их на среду *MS* с витаминами В-5 *Gamborg*, дополненную 2,4-Д, кинетин и НУК. Каллусные клетки хорошо индуцировались на среде *MS* с 0,1 мг/л 2,4-Д и в варианте с 0,1 мг/л 2,4-Д + 0,1 мг/л НУК.

Первый пассаж каллусных клеток проводили через 25-28 дней в суспензионной среде на качалках с частотой качания 120 колебаний в минуту. Качалки находились в культуральной комнате при освещении 2-3 тыс. люкс, температуре $+24 \pm 3^\circ\text{C}$ и относительной влажности воздуха 70 %.

Результаты исследований показали, что в первой субкультуре каллусные клетки имеют различную форму. Чаще всего они уд-

линейные, содержимое ядерного аппарата и цитоплазмы хорошо просматриваются, наблюдается скопление нескольких каллусных клеток в небольшие агрегаты. Оболочка клеток нормальная, в росте клеток особых нарушений не наблюдается.

Второй пассаж проводили через 26-28 дней. Для этого каллусные клетки пропускали через марлю в свежую питательную среду, которая по составу соответствовала среде первого субкультивирования. Во втором пассаже суспензия приобрела темно-коричневый цвет. Наблюдалось уплотнение массы каллусных клеток без появления их крупных агрегатов.

В данной суспензионной среде клетки имеют различные формы и размеры — от округлых до удлинённых, от крупных до мелких. Плотная структура клеток свидетельствует о приближении к оптимальности состава питательной среды для роста каллусов данного сорта.

Второй пассаж на суспензионной среде также проводили в течение 28-30 дней, после чего каллусные клетки отфильтровывали через капроновое сито и супернатант, т.е. густую массу каллусных клеток, высевали на агаризованную среду, состоящую из элементов среды MS с витаминами B-5 Gamborg без фитогормонов. Повторности опытов по индукции каллусогенеза и субкультуры на суспензионной среде всегда проводились по этой схеме.

Масса каллусных клеток на агаризованной среде быстро приобретала темно-коричневый цвет. На этой среде первые 2 месяца не наблюдалось прироста каллусных клеток. Четвёртый пассаж не давал положительного эффекта, поэтому пришлось длительное время сохранять третью субкультуру. На третий месяц её культивирования было отмечено начало роста новых клеток с различных участков. Клетки имели бледно-коричневый цвет и рыхлую структуру. Они очень быстро покрывали поверхность старых клеток. На поверхности новых клеток наблюдалось формирование соматических эмбриоидов бледно-жёлтого цвета. При субкультивировании этих клеток на среде MS без фитогормонов на 10-12-й день начинали образовываться соматические эмбриониды. Последние хорошо формировались в течение 28-30-дневного культивирования. Повторяемость опытов по получению соматических эмбриоидов была высока — около 40-50%.

Повышение концентрации KNO_3 в 2 раза в среде MS, предло-

женной N.Trolinder et.al. [330] в нашем опыте по соматическому эмбриоидогенезу не дало положительного эффекта.

При субкультивировании эмбриогенных клеток на среде MS без фитогормонов, каллусные клетки хорошо росли, имели различную форму, комкообразную структуру, бледно-коричневый цвет. На эмбриогенных каллусных клетках с 10-12-дня культивирования образовывались маленькие соматические эмбриониды (около 30-35 %), которые не были дифференцированы на корешок и семядольные листья. Более чем у 50 % соматических эмбриоидов с момента дифференциации начинали формироваться семядольноподобные листья и корешок.

Такие зародыши мы назвали эмбриоидами по I.Vasil и A.Hildebrandt [333], которые, обобщая разнообразие зародышеподобных структур, возникающих в культурах растительной ткани *in vitro* и в процессе бесполого размножения растений *in situ* и *in vivo*, предложили термин «эмбрионид».

В разрабатываемой Т.Б.Батыгиной [54] концепции репродукции эмбрионид рассматривается как зародышеподобная биполярная структура, образующаяся асексуально, как зачаток нового растительного организма, как одна из структурных единиц бесполого размножения цветковых растений *in vivo* и *in vitro*. Автор концепции предлагает выделять эмбрионидогенный тип репродукции, рассматривать эмбрионидогенез как особый способ образования нового индивидуума, а эмбрионидогенез — как оригинальный способ образования спорофита при гомофазном воспроизведении. Эмбрионид, аналогично зиготическому зародышу, характеризуется сопряженным развитием апексов побега и корня, развиваясь как отдельная (от материнского организма или каллуса) единая система с закрытым радикулярным полюсом.

Известно, что в отличие от зиготических зародышей *in vivo* у соматических эмбриоидов *in vitro* отсутствуют интегументы, нуцеллус и эндосперм, который заменяет искусственная питательная среда. Естественно, что питательная среда не может полноценно заменить функции эндосперма, и поэтому получить классическую картину эмбрионидогенеза на соматических эмбриоидах хлопчатника не удастся. Тем более, второй этап субкультивирования для получения соматических эмбриоидов проводится без участия экзогенных фитогормонов.

В задачу наших исследований не входило изучение этапов эмбриогенеза или эмбриондогенеза (по Батыгиной) [54], а решалась проблема получения регенерации из каллусных клеток хлопчатника для дальнейших исследований по клеточной селекции.

Для изучения морфологии клеток и формирования соматических эмбриондов индуцированный в течение 25-30 дней каллус в асептических условиях высевали в безгормональную суспензионную среду. Второе субкультивирование также проводили в течение 30-ти дней, после чего её пропускали через капроновое сито. Супернатант высевали на агаризованную морфогенную среду MS с витаминами B-5 Gamborg. Каллусные клетки на твёрдой среде культивировались в факторостатном помещении в течение 30-90 дней без субкультивирования. Формирование новых каллусных клеток и соматических эмбриондов изучали визуальным наблюдением.

Соматические эмбрионды различного размера культивировали на питательной среде, разработанной для культуры незрелых зиготических зародышей хлопчатника А.Азизходжаевым [15], которая состоит из следующих компонентов:

Макроэлементы, мг/л	
KNO ₃	810
NH ₄ NO ₃	800
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	200
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	166
KH ₂ PO ₄	70
FeNa · ЭДТА	37
Микроэлементы, мг/л	
H ₃ BO ₃	10,0
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,01
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,1
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,01
KI	0,3
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	10,0
ZnSO ₄ · 4 H ₂ O	5,0
Витамины, мг/л	
Тиамин-HCl	0,2
Пиридоксин-HCl	0,8
Никотиновая кислота	0,6

Глицин	4,0
Инозит	50,0

Сахароза	30 000
Агар	0,7 %
pH	5,5

Твердая селективная среда составлена на основе MS с витаминами B-5 Gamborg и фитогормонами НУК + кинетин и различным содержанием NaCl (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8; 2,0 %).

Соматические эмбрионды фиксировались в растворе Карнуа (6:3:1) по З.П.Паушевой [142]. Дальнейшая обработка материала проводилась по общепринятой цитозембриологической методике. Материал парафинировали в термостате при температуре +58°C в течении 3-х суток. Для получения микротомных срезов использовали салазочный и ротационный микротомы. Толщина срезов 12-20 мкм. Препараты окрашивали гематоксилином по Гейденгайну и реактивом Шиффа.

Препараты просматривали под микроскопами МБИ-3, МБР-3. Микрофотографии выполнены с помощью микрофотонасадок МФН-11 и МФН-12.

На рис. 41 приведены различные формы дифференцированных соматических эмбриондов, а на рис. 42 – внешний вид зиготических эмбрионов хлопчатника *in vivo*: здесь можно отметить их явное сходство. Однако в соматических эмбрионах отсутствует упорядоченность формирования семядольных листьев, отсутствуют типичные центры полярной организации – эпифизис и гипофизис, нарушена нормальная организация главного корня.

Несмотря на это, в некоторых случаях наблюдается нормальное формирование отдельных частей зародыша *in vitro*, например, корешка или семядольного листа. Эти результаты свидетельствуют о том, что полученные нами зародыши являются соматическими эмбрионами в отличие от адвентивных почек.

Для исследования развития меристематических тканей и проводящих сосудов проводили анатомическое изучение различно дифференцированных соматических эмбриондов хлопчатника. На рис. 43 показан анатомический срез глобулярного соматического эмбриона, на котором хорошо видно формирование меристемы роста

и проводящих сосудов внутри него. На рис. 44 показан анатомический срез соматического эмбриоида сердечковидной формы, в котором клетки хорошо упорядочены, наблюдается начало формирования проводящей ткани и образование семядольных листьев. На рис. 45 приведен анатомический срез дифференцированного на семядольные листья соматического эмбриоида. Как видно из рис. 45, семядольные листья данного эмбриоида имеют гребешкообразную форму. Несмотря на это, внутренние проводящие ткани в целом очень хорошо сформированы, что может свидетельствовать о нормальном переходе эмбриоида к росту.



Рис. 41. Внешний вид соматических эмбрионидов



Рис. 42. Внешний вид *in vivo* зиготических эмбрионов хлопчатника (1 – 5- и 2 – 7-дневные)

Автономность эмбрионидов, т.е. их переход к росту, на искусст-

венных питательных средах проявляется на различных стадиях их развития в зависимости от вида растения. У одних культур эмбриониды являются автономными в период перехода от глобулярной формы к сердечковидной [205, 288], у других – на стадии сердечковидной формы [55, 145], у третьих – на стадии семядольных листьев. Осевые органы этих эмбрионидов укрупняются, однако структурного образования не наблюдается. Переход эмбрионидов к росту здесь зависит от степени автономности. По данным ряда авторов [205, 308, 312] у большинства двудольных растений эмбриониды становятся автономными, т.е. вне организма, при минерально-сахарозном питании и переходят к росту к моменту дифференциации семядольных листьев. Это, по всей вероятности, связано с формированием меристем эпикотильярной части эмбриоида.

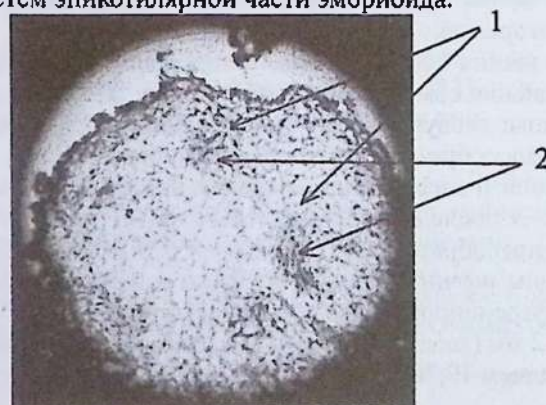


Рис. 43. Анатомический срез глобулярного соматического эмбриоида: 1 – меристема эмбриоида, 2 – проводящие сосуды (увеличение $\times 120$)



Рис. 44. Анатомический срез сердечковидного соматического эмбриоида: 1 – семядольные листья (увеличение $\times 120$)

При изучении становления автономности *in vitro* при отдаленной межвидовой гибридизации хлопчатника А.Азизходжаевым [19] было установлено, что из гибридных зиготических зародышей со слабо развитыми семядольными листьями и хорошо сформированными корешками (размером 2-2,5 мм) около 50 % переходят к росту. По мнению автора, автономность гибридных зиготических зародышей хлопчатника *in vitro* наступает в период формирования семядольных листьев, а точнее – в период «лотоса» (промежуточная фаза между сердцевидной формой и семядольными листьями).

Подобные исследования на соматических эмбрионах проводились R.C.Shoeemaker et.al. [314]. Они разделили дифференцированные эмбрионы на 4 группы: глобулярные, сердцевидные, тюльпан и зрелые.

В наших исследованиях также наблюдается различная дифференциация соматических эмбрионов, которые мы разделили на 4 группы: глобулярные, сердцевидные, дифференцированные на гребешкообразные семядольноподобные листья, которые назвали «лотос» и дифференцированные на семядольные листья и корешок. В последней группе семядольные листья полукруглые или гребешкообразные. По данным R.C.Shoeemaker [313] зрелые эмбрионы имеют длину 2,770 мм, а в наших исследованиях длина дифференцированного соматического эмбриона составляет от 2,5 до 4,2 мм (табл. 34). При этом масса зрелого эмбриона составляла в среднем 19,70 мг.

Таблица 34

Морфологическая характеристика соматических эмбрионов

Стадия эмбрионов	Масса, мг	Размеры эмбрионов, мм					
		длина			ширина		
		предел колебаний	среднее, мм	CV	предел колебаний	среднее, мм	CV
1. Глобулярная	2,11	0,55-0,97	0,76±0,04	17	0,65-0,87	0,74±0,04	17
2. Сердцевидная	5,43	1,20-1,74	1,62±0,07	20	0,91-1,24	1,14±0,06	19
3. Лотос	11,12	1,70-2,34	2,10±0,09	22	0,93-1,29	1,13±0,05	18
4. Дифференцированная на осевые органы	19,70	2,50-4,20	3,10±0,01	23	1,62-2,12	1,94±0,09	22



Рис. 45. Формирование семядольных листьев на соматическом эмбрионе: 1 – семядольные листья (увеличение x 120)

Соматические эмбрионы этих 4-х групп высевали на питательную среду, предложенную А.Азизходжаевым [15], дополненную низкими концентрациями фитогормонов и без них.

Таблица 35

Переход к росту различных форм соматических эмбрионов хлопчатника (основа среды А. Азизходжаева)

Фитогормон	Концентрация, мг/л	Количество эмбрионов, %			
		глобулярные	сердцевидные	лотос	дифференцированные на осевые органы
ИУК	0,1	-	-	12	18
	1,0	-	-	-	10
НУК	0,1	-	-	9	14
	1,0	-	-	-	-
2,4-Д	0,1	-	-	-	-
	1,0	-	-	-	-
Кинетин	0,1	-	-	-	-
	1,0	-	-	-	-
БАП	0,1	-	-	-	-
	1,0	-	-	-	-
Без фитогормонов		-	-	43	87

Повторность опыта 6-кратная, в каждой повторности высевали по 20 эмбрионов.

Как видно из табл. 35, в средах с фитогормонами и без них эмбрионы, дифференцированные до глобулярной и сердечковидной формы, не переходят к росту. Эмбрионы же, сформировавшие буркообразные семядольные листья с корешком в виде торпеды, только при низких концентрациях ИУК и НУК способны на искусственных питательных средах переходить к росту.

Н.Н.Круглова [108], изучая сорта и гибридные линии яровой мягкой пшеницы, установила, что определяющую роль в индукции того или иного пути морфогенеза играл баланс между эндогенным содержанием ИУК (в составе морфогенного каллуса в момент инокуляции на среду для регенерации) и концентрацией экзогенной ИУК (в составе среды для регенерации). В каллусах, полученных из незрелых зародышей пшеницы, введенных в культуру на одной стадии развития и культивируемых на одной питательной среде, либо индуцировались различные типы органогенеза, либо последний не наблюдался.

Одна из возможных причин этого явления — неоднородность каллуса, который состоит из групп клеток, реализующих морфогенетические потенции различными путями. Важную роль играют связи между группами клеток в каллусе, что в свою очередь обусловлено их формой и размером. Вероятно, немаловажную роль играет зависимость эффекта, вызываемого гормонами, от физиологической характеристики клеток-мишеней [100].



Рис. 46. Растение, полученное из соматического эмбриона

По мнению некоторых учёных [47], для получения жизнеспособных эксплантов тюльпана и увеличения их приживаемости в культуре *in vitro* рекомендуется использовать дифференцированные торпедовидные зародыши размером 1,5-3,0 мм.

Полученные из эмбрионов в стадии «плотоса» растения через месяц культивирования достигают размера 1,2-1,8 см. В безгормональной среде эмбрионы, хорошо дифференцированные на осевые органы (здесь подразумеваются явно выраженные гребешкообразные семядольные листья и вытянутые торпедообразные корешки), легко переходят к росту и через 30-35 дней культивирования на гребешкообразных семядольных листьях начинает образовываться нормальная эпикотильная часть растения с хорошо сформированными листьями. В течение месяца культивирования растения достигают размера 2,4-4,0 см (рис. 46).

Здесь необходимо отметить, что при культивировании растений хлопчатника на искусственной питательной среде по мере роста корни постепенно чернеют. По мнению А.Азизходжаева [15] это, возможно, связано с окислением элементов питательного вещества за счёт выделения некоторых веществ из корней растений. В лаборатории «Биохимия и физиология хлопчатника» УзНИИССХ разработана методика пересадки растений с почерневшими корнями из пробирки в грунт (см. ранее).

ГЛАВА 9

БИОЛОГИЯ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК ХЛОПЧАТНИКА НА СЕЛЕКТИВНЫХ СРЕДАХ С NaCl

В мировой литературе приводятся многочисленные данные по соматоклональной изменчивости культивируемых *in vitro* клеток растений. Соматоклональная изменчивость зависит от различных факторов, например, от влияния исходного экспланта, условий культивирования, а также её длительности, влияния физических и химических факторов и ряда других условий.

Ряд исследователей [204, 206, 208, 220, 240, 241, 260, 266, 267, 270, 275, 281, 291] указывают на то, что культура клеток с возрастом становится более склонной к генетическим изменениям, поскольку повышается её мутационная активность. Возникающие на ранних этапах культивирования клеток и тканей мутации активно селекционируются, что приводит к увеличению со временем доли мутантных клеток в популяции.

Доказана зависимость соматоклональной вариабельности от генотипа растений. На различных генотипах овса [275], кукурузы [341], пшеницы [278], люцерны [286], картофеля [128] показано, что способность к генетическим изменениям даже в пределах одного вида может существенно варьировать. Аналогичные результаты получены и в ряде других работ [113, 169, 212, 260, 269, 280].

В культуре *in vitro* клеток растений соматоклональная изменчивость наблюдается на различных уровнях: морфологическом, цитогенетическом, хромосомном и биохимическом [88, 199, 211, 213, 258, 259, 268, 277, 283, 284, 295, 304, 315, 322, 323].

В изученной нами литературе исследования, связанные с соматоклональной вариабельностью при культивировании *in vitro* хлопчатника, не проводились. Это, возможно, связано с тем, что хлопчатник отличается трудной регенерационной способностью. Регенерацию удалось получить лишь на отдельных сортах и то с большим трудом. Несмотря на это, как и другим культурам, хлопчатнику, возможно, присуща соматоклональная вариабельность клеток при культивировании *in vitro*.

Кроме этого, также неизвестна степень устойчивости культивируемых клеток хлопчатника к определённым конкретным агентам, т.е. неблагоприятным факторам, используемым в качестве селек-

тируемых сред. Одним из классических факторов селективируемых сред является засолённая среда, которая напрямую связана с практической селекцией – создание устойчивых к засолению растений. В данном разделе исследована реакция культивируемых каллусных клеток хлопчатника на засоление, вызванное применением различных концентраций NaCl в искусственной питательной среде.

В литературе встречаются различные подходы к изучению первичных этапов клеточной селекции на устойчивость к определённым неблагоприятным факторам среды. Например, для получения большого спектра устойчивых клеток воздействуют физическими и химическими мутагенами на семена, растения и зародыши, после чего, индуцируя каллусные клетки, проводят клеточную селекцию [190, 225, 236, 237, 253, 271, 310, 327]. В других вариантах ткани культивируют на селективной среде и из неё индуцируют каллусные клетки [223, 274, 285, 329, 330, 339] и в последнем варианте напрямую на каллусных клетках начинают селекционную работу, используя каллусные клетки различного пассажа [221, 232, 272, 303, 305, 328].

Как многократно отмечалось, у хлопчатника трудно добиться соматического эмбриоидогенеза. Поэтому для изучения реакции каллусных клеток хлопчатника на засоление исследования проводили в двух направлениях:

- 1) изучение каллусогенеза на засолённых средах;
- 2) изучение эмбриогенных каллусных клеток на суспензионных селективных средах.

9.1. Культура *in vitro* ткани гипокотыла хлопчатника на засолённых средах с NaCl

Известно, что отдельные клетки в отличие от целого организма могут приспосабливаться к условиям среды. В одиночно живущих клетках не существует тканевого барьера, и, кроме этого, свободно живущие клетки часто имеют разную плоидность и отличаются спонтанным мутагенезом. Всё это представляет большой интерес с точки зрения селекции клеточных культур.

К настоящему времени клеточная селекция сельскохозяйственных растений достигла больших успехов. Например, под руководством профессора Б.П.Строгонова (ИФР РАН) получены каллусные клетки, устойчивые к засолению (0,7 % Na₂SO₃), тогда как контроль

был устойчив лишь к 0,01%. Yano Shin-ichi и др. [338] при отборе клеток, устойчивых к солям, в питательную среду добавляли морскую воду. В результате были получены устойчивые к солям растения, которые цвели и дали семена. С.Р. Meredith и др. [276] на среде с токсичными солями алюминия выделили устойчивые линии, из которых регенерированы фертильные растения. И.Д. Никифорова и др. [136] получили устойчивые к 1,5 % NaCl линии пшеницы. Е.И. Комизерко и др. [104] выращивали каллусную ткань гипокотили и корня фасоли на среде MS с NaCl.

Мы в своих исследованиях также использовали сегменты гипокотили сорта *Coker-312* и культивировали их на засолённой среде, используя 7 вариантов различной концентрации NaCl. Результаты исследований показали, что добавление в агаризованную питательную среду 0,2 % NaCl существенно не влияет на индукцию каллусогенеза из ткани гипокотили (рис. 47). Такая же картина наблюдалась и во втором варианте с 0,4 % NaCl. Однако, если обратить внимание на характер появления каллусных клеток, то можно заметить некоторое отклонение от контрольного варианта. Если у контроля при индукции через определённое время каллусные клетки становятся более твёрдыми, приобретая бледно-зелёный цвет и на каллусной ткани продолжают расти плотные, хрупкие и не смазывающиеся клетки бледно-кремового цвета, то в вариантах с 0,2 % и 0,4 % NaCl индуцированные каллусные клетки мягкие и смазывающиеся, цвет кремовый с болотным оттенком. По интенсивности каллусогенеза между контролем и этими вариантами существенной разницы не наблюдалось.

Повышение концентрации NaCl в питательной среде до 0,8 % (рис. 48) начинает задерживать индукцию каллусогенеза на сегментах гипокотили. В этом варианте индуцированные каллусные клетки значительно твёрже с белым налётом на поверхности. Несмотря на это, на отдельных сегментах гипокотили продолжается рост каллусных клеток более мягкой консистенции.

При повышении концентрации NaCl в среде до 1,0 % в разных колбах индукция каллусогенеза протекает по-разному, т.е. в отдельных случаях каллус индуцируется незначительно, в других — из высаженных шести-восьми сегментов гипокотили лишь в двух-трёх индуцируются каллусные клетки. На рис. 49 представлен вариант, где в среде, содержащей 1,0 % NaCl, на всех сегментах гипокотили происходит индукция каллусогенеза.

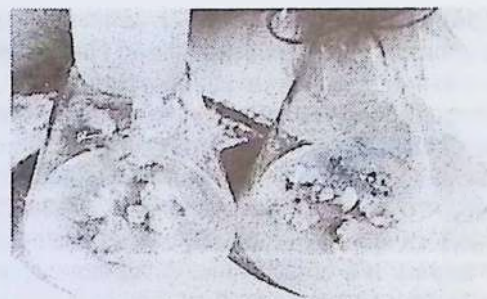


Рис. 47. Индукция каллусогенеза на засолённой среде (слева — контроль, справа — опыт 0,2 % NaCl)

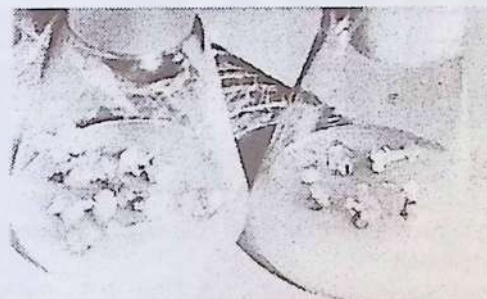


Рис. 48. Индукция каллусогенеза на засолённой среде (слева — контроль, справа — опыт 0,8 % NaCl)



Рис. 49. Индукция каллусогенеза на засолённой среде (слева — контроль, справа — опыт 1,0 % NaCl)

На рисунке 50 наглядно демонстрируется зависимость индукции каллусогенеза хлопчатника от концентрации NaCl в среде, а на рис. 51 ясно видно, что при повышении концентрации NaCl до 1,2 % прекращается индукция каллусогенеза из гипокотилиа хлопчатника. В данном случае большинство сегментов набухает, чернеет и высыхает. Образование трещин на гипокотиле не наблюдается. Из этого варианта видно, что содержание в среде 1,2 % NaCl губительно влияет на физиологические процессы, связанные с индуцированием каллусных клеток и в общем – на физиологические процессы жизнедеятельности ткани гипокотилиа.



Рис. 50. Индукция каллусогенеза на среде MS с различной концентрацией NaCl

Варианты сред: 1 – контроль; 2 – 0,2 % NaCl; 3 – 0,4 % NaCl; 4 – 0,6 % NaCl; 5 – 0,8 % NaCl; 6 – 1,0 % NaCl; 7 – 1,2 % NaCl; 8 – 1,4 % NaCl; 9 – 1,6 % NaCl; 10 – 1,8 % NaCl; 11 – 2,0 % NaCl



Рис. 51. Индукция каллусогенеза на засолённой среде (слева – контроль, справа – опыт 1,2 % NaCl)

Дальнейшее повышение концентрации NaCl в среде, в частности до 1,4 и 1,8 % также вызывает высыхание гипокотилиа хлопчатника (рис. 52).

Из проведённых исследований видно, что гипокотиль хлопчатника способен индуцировать каллусные клетки на средах, содержащих до 1,0 % NaCl. Более высокие концентрации NaCl в среде (1,2-1,4 %) подавляют образование каллусных клеток. Как видно из этого опыта, для получения каллусных клеток, устойчивых к более высоким концентрациям соли (NaCl) в данных условиях невозможно, так как при высоких концентрациях засоления гипокотиль утрачивает способность к индукции каллусогенеза.

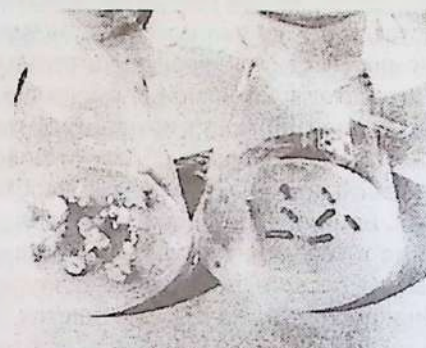


Рис. 52. Индукция каллусогенеза на засолённой среде (слева – контроль, справа – опыт 1,4 % NaCl)

Из литературы известно, что для получения эмбрионных каллусных клеток необходимо проводить субкультивирования каллусных клеток на суспензионной среде. Только в этих условиях могут отселектироваться каллусные клетки, устойчивые к засолению и способные к регенерации. В связи с этим мы изучали суспензионную культуру клеток.

9.2. Суспензионная культура клеток хлопчатника на засолённых средах

Суспензионные культуры – отдельные клетки или группы клеток, выращиваемые во взвешенном состоянии в жидкой среде. Они

представляют собой относительно гомогенную популяцию клеток, которую легко подвергнуть воздействию химических веществ.

Для суспензионных культур исходным материалом могут быть как изолированные целые клетки выбранного органа растения, так и измельченный каллус. Образовавшиеся клетки помещают в жидкую питательную среду и культивируют при постоянном перемешивании. Рост суспензионной культуры происходит во многих случаях существенно быстрее, чем каллусной культуры, поскольку скопления клеток поглощают питательные вещества значительно большей общей поверхностью, а у каллуса это происходит лишь в той его части, которая соприкасается с субстратом. При этом происходит деление клеток, новые клетки не отделяются, и их скопление увеличивается. С помощью особых приемов суспензионную культуру можно перенести на твердую питательную среду. Здесь из клеток или агрегатов клеток может образоваться способный к жизни каллус. В суспензии могут возникнуть также и зародыши, которые после их переноса на агар образуют новое растение.

Так как для культивирования суспензий необходимо постоянно их перемешивать, нами использовались качалки.

В нашем опыте в качестве исходного материала для суспензионной культуры мы также использовали каллусную массу. Около 3 г эмбриогенноспособных каллусных клеток вносили в колбу объемом 50 мл и переносили на качалку с частотой 120 об./мин. и освещенностью 1500-2000 люкс. Здесь необходимо отметить, что при такой интенсивности освещения при визуальных наблюдениях каллусные клетки растут значительно интенсивнее, чем при высоком (4000-5000 люкс) освещении.

После 20 дней культивирования суспензионных клеток проводили второй пассаж, где содержимое каждой колбы разливали в две, добавляя туда свежую питательную среду с таким расчетом, чтобы в каждом варианте концентрация NaCl оставалась прежней. После 15 дней культивирования из второй субкультуры суспензионные клетки отбирали для исследования их структуры и морфологии.

Измерение размеров клеток проводили с использованием окулярного винтового микрометра МОВ-1-15. Отсчет проводили по шкале (в миллиметрах) и барабану (в сотых долях миллиметра).

Для определения увеличения объектива микроскопа на его столик помещали объект-микрометр, на тубус надевали винтовой

окулярный микрометр и фокусировали на резкость изображения перекрестия и шкалы объект-микрометра.

Линейное увеличение объектива определяли по формуле

$$V = \frac{\Pi - I}{a \times b},$$

где V – увеличение объектива;

Π – второе измерение окуляр-микрометра;

I – первое (начальное) измерение окуляр-микрометра;

a – число делений объект-микрометра;

b – цена деления объект-микрометра.

Для измерения величины клеток на столик микроскопа помещали приготовленный из данной суспензии временный препарат. Затем центр перекрестия совмещали с краем изображения объекта и делали отсчет. Потом перекрестие совмещали со вторым краем объекта и снова делали отсчет.

Величину клеток определяли по формуле

$$C = \frac{\Pi - I}{V},$$

где C – величина клеток;

V – увеличение объектива;

Π – второе измерение окуляр-микрометра;

I – первое (начальное) измерение окуляр-микрометра.

Количество клеток считали с помощью счетчика Гейгера.

Исследования каллусных клеток в суспензионной среде под световым микроскопом показали, что в данных условиях клетки имеют различную форму. В большинстве случаев наблюдаются удлинённые, скрученные или полусогнутые клетки. Длина клеток в суспензионных условиях различна, поэтому по форме клетки разделили на 4 группы. Очень мелкие клетки имели округло-овальную форму. В контрольном варианте размеры клеток были в среднем 60 мкм в длину и 45-51 мкм в ширину. Такие клетки в наших исследованиях составляли лишь 2-4 % (табл. 36). В данном варианте больше всего встречаются клетки маленького и среднего размера 43 и 35 шт. соответственно. К маленьким относили клетки, имеющие длину 65-128 мкм, к средним – 131-197 мкм. Ширина их составляла 32-72 мкм и 27-93 мкм соответственно. 12 % клеток имели большие и очень большие размеры – длину от 201 до 288

мкм и ширину 25-86 мкм. Клетки контрольного варианта показаны на рис. 53. Как видно, цитоплазма клеток расположена равномерно, органоиды, в основном пластиды, хорошо видны, в цитоплазме расположены свободно. Двухслойная мембрана клетки чётко выражена и плотно прилегает к ней.

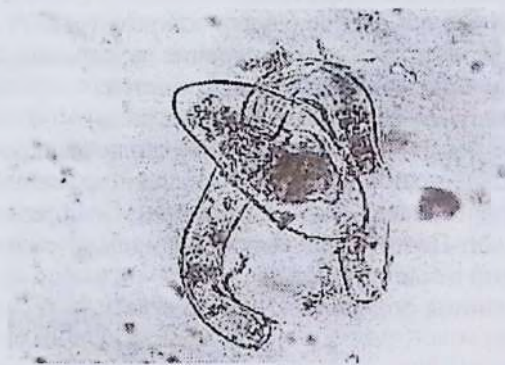


Рис. 53. Клетки, растущие в суспензионной среде (контроль).
(увеличение $\times 300$)

При помещении клеток в среду с 0,2 % NaCl заметных морфологических изменений не наблюдается. Однако, несмотря на это, при указанной концентрации NaCl отмечается уменьшение количества клеток (см. рис. 57). Необходимо также отметить, что большинство клеток приобретают округло-овальную форму (рис. 54) и уменьшаются в размере по сравнению с контрольным вариантом. Как установлено, при 0,2 % концентрации NaCl количество округлых клеток доходит до 10 % (см. рис. 54), количество очень мелких – до 18-20 % (см. табл. 36). Кроме того, наблюдается резкое уменьшение количества больших клеток. Следует отметить, что и у контрольного, и у опытного вариантов встречаются клетки различных размеров, длина которых колеблется в пределах от 42-46 мкм до 243-281 мкм. Ширина их в суспензии также заметно не увеличилась и находится в пределах контрольного варианта. При наблюдении изучаемых вариантов под световым микроскопом отмечается разное состояние клеток. Например, на рис. 55 показана нормально

развивающаяся в суспензионном растворе клетка. Отсюда видно, что 0,2 % -ная концентрация NaCl не оказывает существенного влияния на её морфологию. Органоиды цитоплазмы в клетке расположены нормально. Какие-либо изменения на внешней мембране и в промежутках между мембраной и цитоплазмой не наблюдаются.

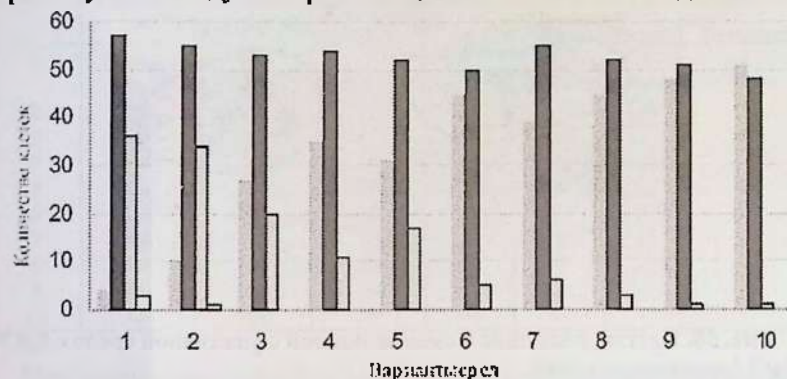


Рис. 54. Соотношение разных типов клеток на засоленных средах с NaCl, %

■ округлые ■ овальные □ удлиненные □ пластинчатые

Варианты сред: 1 – контроль; 2 – 0,2 % NaCl; 3 – 0,4 % NaCl; 4 – 0,8 % NaCl; 5 – 1,0 % NaCl; 6 – 1,2 % NaCl; 7 – 1,4 % NaCl; 8 – 1,8 % NaCl; 9 – 2,0 % NaCl; 10 – 3,0 % NaCl



Рис. 55. Клетка, растущая в суспензионной селективной среде с 0,2 % NaCl (увеличение $\times 300$)

Число клеток различных размеров

Вариант	Концентрация NaCl, %	Общее число измеренных клеток, шт	Величина клеток, шт.				
			очень мелкие	мелкие	средние	большие	очень большие
1	Контроль	101	2	43	35	14	7
2	0,2	101	18	45	32	4	2
3	0,4	102	21	52	25	3	1
4	0,8	101	26	58	15	2	-
5	1,0	100	23	58	16	2	-
6	1,2	104	28	62	12	2	-
7	1,4	100	36	60	4	-	-
8	1,8	101	38	59	4	-	-
9	2,0	100	44	54	2	-	-
10	3,0	100	56	44	-	-	-

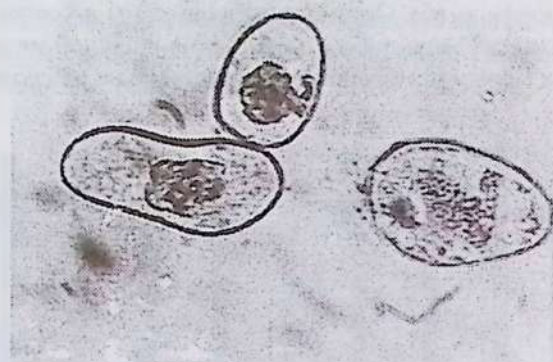


Рис. 56. Клетки, растущие в суспензионной селективной среде с 0,4 % NaCl (увеличение $\times 300$)

При помещении клеток в суспензионную среду с 0,4 % NaCl, в процессе культивирования наблюдается заметное изменение их морфологии. В этом варианте отмечается увеличение доли мелких клеток до 20 % (см. табл. 36), т.е. на 2 % больше по сравнению с предыдущим вариантом. Появление округлых клеток также свидетельствует о заметном влиянии 0,4 % раствора NaCl на их морфологическое состояние. При этой концентрации раствора преобладающее большинство клеток принимают округло-овальную форму. Несмотря на появление клеток различных размеров, в 0,4 %-ном растворе NaCl гигантских клеток обнаружено не было. Размер самых маленьких клеток не превышает 50 мкм. Клетки, выращенные при 0,4 % NaCl, показаны на рис. 56, из которого видно, что данная концентрация приводит к образованию клеток, имеющих округлую и овальную формы. Также видно, что у них между двухслойной мембраной и цитоплазмой образуется узкое пространство. Кроме того, органоиды цитоплазмы скучиваются, т.е. под влиянием 0,4 % концентрации соли они смещаются в центр клетки. Цитоплазматическая жидкость находится в гомогенном состоянии.

При выращивании клеток хлопчатника в суспензионном растворе с 0,8 % NaCl в первую очередь увеличивается количество мелких клеток (табл. 36). Это происходит за счёт уменьшения доли больших клеток. При сравнении клеток контрольного варианта с клетками, выращенными при 0,8 % растворе NaCl можно увидеть две резко отличающиеся друг от друга картины. В контрольном варианте отмечается появление кривых неравномерных клеток с различной длиной, а в опытном – в основном отмечается образование овально-округлых клеток. Здесь необходимо особо отметить, что, начиная с концентрации 0,4 % NaCl, в суспензии резко уменьшается количество клеток (рис. 57). Этот показатель свидетельствует о том, что, начиная с вышеуказанной концентрации селективная среда замедляет рост и развитие (деление) клеток, т.е. действует в качестве неблагоприятного фактора. Среднее количество клеток в 0,4 %-ном суспензионном растворе NaCl составляет 7130 шт, а при 0,8 % - 5230 шт. Типичное состояние клеток, выращенных в среде с 0,8 %, NaCl показано на рис. 58, откуда видно, что основное их количество овальной формы и бледного цвета. Цитоплазма заметно отошла от двухслойной мембраны, что свидетельствует о влиянии концентрации соли на выход воды из клетки – наблюдается явление плазмолиза. Органоиды клеток также смещены в одну сторону. В суспензии не отмечено мёртвых и освобождённых от

органовидов клеток. На рис. 59 показана нормально развивающаяся клетка, выращенная при 0,8 % NaCl и готовая к очередному делению. Она по своему внешнему виду напоминает клетку, выращенную в нормальных условиях. Среди выращенных в 0,8 % растворе NaCl встречаются клетки среднего и большого размеров, имеющие длину 230-250 мкм и ширину 60-80 мкм. Это составляет около 2-3 % от их общего числа (см. табл. 36). Основное количество клеток приходится на долю мелких.

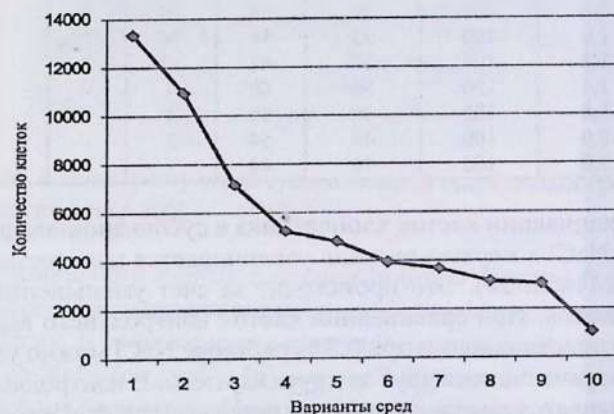


Рис. 57. Количество клеток в суспензионных селективных средах с NaCl
Варианты сред: 1 – контроль; 2 – 0,2 % NaCl; 3 – 0,4 % NaCl; 4 – 0,8 % NaCl; 5 – 1,0 % NaCl; 6 – 1,2 % NaCl; 7 – 1,4 % NaCl; 8 – 1,8 % NaCl; 9 – 2,0 % NaCl; 10 – 3,0 % NaCl

Клетки, выращенные в питательной среде, содержащей 1,0 % NaCl по количеству, размеру и внешнему виду близки к таковым, выращенным в среде с 0,8 % NaCl. На данном уровне, по нашей классификации, встречается 4 категории клеток: очень мелкие – 20 %, мелкие – 60 %, средние – 16 % и большие – 2 %.

По форме соотношение клеток, растущих в среде с 1 % NaCl также близко к таковым, растущим в среде с 0,8 % NaCl, т.е. они имеют округлую и овальную формы. При изучении этих клеток под световым микроскопом видно, что данная селективная среда сильно влияет на их морфологическую структуру. На рис. 60 вид-

но, что вязкость цитоплазмы увеличена – она сжата в средней части клетки, между ней и мембраной образовалось довольно большое пустое пространство.

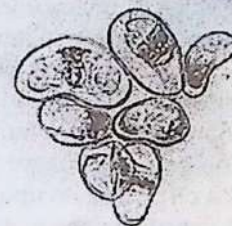


Рис. 58. Клетки, растущие в суспензионной селективной среде с 0,8 % NaCl (увеличение x 120)



Рис. 59. Клетки, растущие в суспензионной селективной среде с 0,8 % NaCl (увеличение x 300)

При повышении концентрации соли в суспензионной среде на 0,2 % (1,2 %) существенной разницы по количеству и форме клеток с предыдущим вариантом (1,0 % NaCl) не наблюдалось.

Повышение концентрации соли ещё на 0,2 %, т.е. при 1,4 % NaCl в среде существенно изменило структурно-морфологический вид клеток и их размеры по сравнению с предыдущими вариантами. В данной среде величина клеток резко уменьшается. Размеры самых маленьких из них колеблются от 32 до 64 мкм в длину и 25-60

мкм в ширину, число которых увеличивается. В около 50 % случаев встречаются клетки овальной формы, имеющие длину от 65 до 120 мкм и ширину – от 38 до 84 мкм. В вышеуказанной среде клетки больших и очень больших размеров отсутствуют.

На рис. 61 видно, что содержимое клеток, выращенных в среде с 1,4 % NaCl стало прозрачным, цитоплазматические органоиды под действием соли сгущились и расположились в различных частях клетки. Однако двухслойная мембрана клетки не повреждена.

При просмотре клеток под микроскопом в этой солевой среде отмечены отдельные клетки, близкие к норме, хотя и меньших размеров (рис. 62). Это говорит о том, что во время культивирования возможно селектирование группы солеустойчивых клеток, которые в данной среде, хоть и с трудом, но продолжают деление и размножение. Мы не можем утверждать, что данные клетки адаптировались к этой селективной среде, поскольку в этом случае, между цитоплазмой и клеточной мембраной должны были быть видны скопившиеся кристаллы солей (см. рис. 61).

При помещении каллусных клеток хлопчатника в среду с 1,8 % NaCl по сравнению с 1,4 % NaCl по размерам и форме существенной разницы не наблюдается. Скорее всего это происходит потому, что, вероятно, дальнейшее уменьшение размеров клеток невозможно. Их количество в 1 мл суспензии также сильно не отличается. Это говорит о том, что 1,4 %-солевая среда является очень жёстким экстремальным фактором для роста каллусных клеток в условиях суспензии.



Рис. 60. Клетки, растущие в суспензионной селективной среде с 1,0 % NaCl (увеличение $\times 120$)

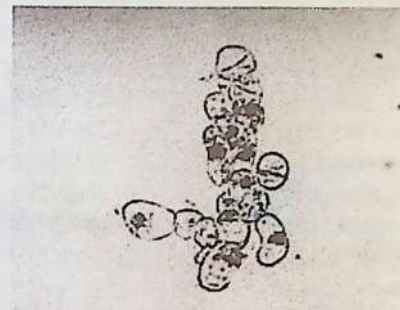


Рис. 61. Клетки, растущие в суспензионной селективной среде с 1,4 % NaCl (увеличение $\times 120$)

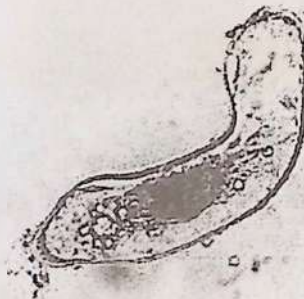


Рис. 62. Клетка, растущая в суспензионной селективной среде с 1,4 % NaCl (увеличение $\times 300$)

При помещении суспензии растущих клеток с 1,8 % NaCl под микроскоп видно, что клетки в среде растут одиночно или группами по 10-20 клеток, которые находятся в агрегативном состоянии.

В данном случае солевая среда сжимает цитоплазму клетки и приводит к её просветлению. На рис. 63 показана оригинальная форма действия солевого стресса на клетки, что напоминает действие предыдущих концентраций NaCl – 1,2 % и 1,4 %, где по форме клетки становятся округлые и овальные, некоторые искривлённо овальные, цитоплазма находится в сжатом состоянии и расположена в различных частях клетки, между мембраной и цитоплазмой наблюдаются пустоты.

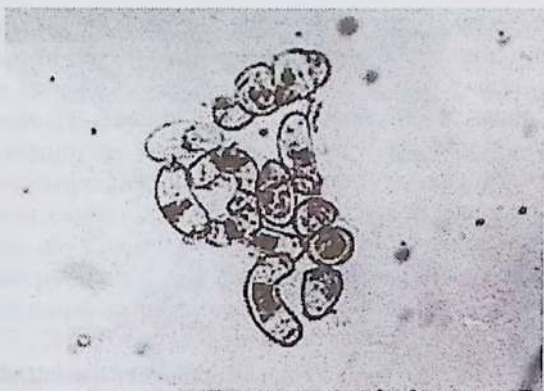


Рис. 63. Клетки, растущие в суспензионной селективной среде с 1,8 % NaCl (увеличение $\times 120$)

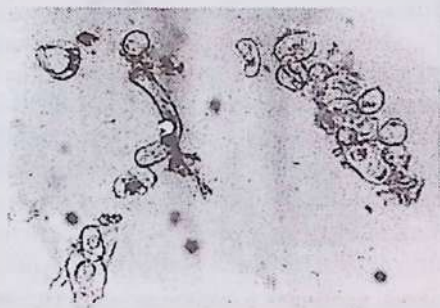


Рис. 64. Клетки, растущие в суспензионной селективной среде с 2,0 % NaCl (увеличение $\times 120$)

При выращивании каллусных клеток в очередной суспензионной среде с 2,0 % NaCl в 1 и 2 субкультуре наблюдали их медленный рост и развитие. В этих условиях большинство клеток приобретали овальную и округлую формы, их размеры резко уменьшались, встречались в основном очень мелкие и мелкие клетки, редко (около 2 %) – средние (см. рис 54, табл. 36).

Среднее количество клеток, растущих в среде с 2,0 % NaCl по сравнению с контролем уменьшается в 4,4 раза, а по сравнению со средой с 1,8 % NaCl на 3–4 %. При изучении клеток, растущих в ис-

следуемой среде, под микроскопом обнаружено, что большинство их приобрели бесцветную окраску, в некоторых случаях сжатая протоплазма расположена в различных участках клетки (рис. 64). Однако, несмотря на это, отмечены отдельные клетки с нормальной морфологией, как показано на рис. 65. Эти клетки, в основном, округлой и овальной формы, органоиды клетки равномерно расположены в цитоплазме, солевая среда на развитие клетки отрицательного влияния не оказала. Возможно, клетки с такой морфологией смогли отселектироваться во время культивирования также как в 7 варианте. При наблюдении под микроскопом количество таких клеток составило около 2–3 %.



Рис. 65. Клетки, растущие в суспензионной селективной среде с 2,0 % NaCl (увеличение $\times 300$)

Таким образом, клетки, выращенные в суспензионной среде, содержащей 2 % NaCl, под действием солевого стресса меняют свою форму, резко уменьшаются в размерах, цитоплазма клетки сжимается, её место, по-видимому, заполняет солевой раствор, мембрана клетки не повреждена.

Однако при этом также встречаются и нормально развивающиеся клетки. Вероятнее всего, они устойчивы к повышенному хлоридному засолению, подтверждением чего является сохранение их нормальной морфологической структуры. К сожалению, количество таких клеток ничтожно мало (всего 0,0002–0,0003 %). Это говорит о том, что в суспензионной культуре среди миллионов клеток встречаются лишь 2–3 солеустойчивые, число которых можно увеличить за счёт дальнейшего пассирования их на питательных средах.

Результаты выращивания каллусных клеток хлопчатника в суспензии с 3 % концентрацией NaCl показали, что во 2 субкультуре количество клеток резко уменьшается, под микроскопом большей частью видны очень мелкие и мелкие клетки, а размеры по длине составляют в среднем 43-65 мкм, по ширине 29-61 мкм, в некоторых случаях отдельные клетки достигают длины 132-189 мкм, ширины ~ 47-75 мкм. При изучении клеток, растущих в вышеуказанной среде, под микроскопом было обнаружено, что цитоплазма большинства клеток почти не просматривается (рис. 66). В некоторых клетках цитоплазма расположена в отдельных её частях. На месте цитоплазмы образовалось бесцветное пространство, однако мембрана клетки сохранилась. При изучении повторностей в данном варианте нормально развивающихся клеток не было обнаружено.



Рис. 66. Клетки, растущие в суспензионной селективной среде с 3,0 % NaCl (увеличение $\times 120$)

Таким образом, при 3 %-ной концентрации NaCl в среде невозможно вести селекционную работу с каллусными клетками хлопчатника.

Исследования, проведённые в суспензионных селективных средах, показали, что при повышении концентрации NaCl резко меняется морфологическая структура клеток, их количество и размеры, т.е. под влиянием соли большинство клеток уменьшаются, приобретают округлую и овальную формы, их количество сокращается в несколько раз. Однако, несмотря на это, некоторые клетки сохраняют нормальную морфологическую структуру даже при высоких концентрациях соли. Последующее размножение идёт за счёт этих клеток.

Дальнейшие исследования проводили с выявленными нами линиями, устойчивыми к 1,0; 1,4 и 2,0 % NaCl.

После того, как клетки дважды культивировали с 20-дневным промежутком в селективной среде, содержащей NaCl, их процеживали через капроновое сито и высаживали на агаровую среду MS с витаминами и без фитогормонов. В связи с тем, что клетки в суспензионных культурах растут одиночно, то после пересадки их на агаровую среду они образуют тонкий слой. Через 5-6 дней культивирования данных клеток часть жидкости, расположенной вокруг них, впитывается, часть испаряется, после чего клетки приобретают светло-коричневый цвет. Здесь следует отметить, что клетки контрольного варианта в постсуспензионный период также становятся светло-коричневыми. Это, вероятно, происходит потому, что в суспензионной культуре клетки росли при низком освещении, за счёт чего синтез хлорофилла замедлялся. Особенно это выражено у клеток, выращенных на засоленном фоне.

Как было показано ранее, клетки после перехода из суспензии на агаровую среду в течение длительного культивирования (1,5-2 месяца) находятся без каких-либо изменений, после чего по краям коричневых клеток начинают расти каллусные клетки беловатого и светло-желтого цвета. А уже из этих клеток в течение 15-20 дней начинают образовываться соматические эмбриониды.

Во второй части опыта во всех вариантах в течение 2 месяцев культивирования в развитии клеток никаких изменений не наблюдалось. Так как клетки располагались на агаровой среде тонким слоем и имели смазывающуюся структуру, их дальнейшее пассирование не представлялось возможным. Исследования проведены в нескольких повторностях и во всех случаях были получены идентичные результаты.

По истечении 2 месяцев культивирования первыми начали расти каллусные клетки контрольного варианта, спустя некоторое время было отмечено начало роста каллусных клеток у солеустойчивых линий.

После 2-х пассажей контрольного варианта и солеустойчивых клеток на агаровой среде MS с витаминами без фитогормонов у каллусной массы наблюдался нормальный рост. При второй суб-

культуре в контрольном варианте было отмечено появление соматических эмбриоидов. Чтобы изучить, как солевые условия влияют на морфологическую структуру каллусных клеток после 2-3-кратного пассирования, их исследовали под световым микроскопом. Морфология клеточных линий, устойчивых к 1,0 % NaCl показана на рис. 59, откуда видно, что клетки, в отличие от солевых условий, имеют свою прежнюю удлинённую и овальную формы, органоиды цитоплазмы расположены в свободном состоянии, между мембраной и цитоплазмой клетки свободного пространства не образовывается.

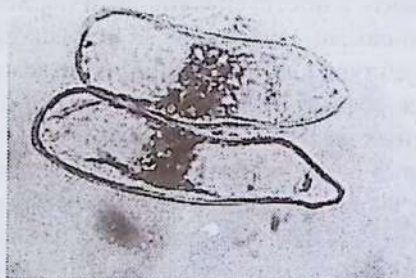


Рис. 67. Клетки линии, устойчивые к 1,0 % NaCl (увеличение x 300)

На рис. 68 приведён внешний вид клеточных линий, устойчивых к 1,4 % NaCl, где видно, что солеустойчивые клетки этих линий после помещения в среду без NaCl снова переходят в своё первоначальное состояние. При изучении этих клеток под световым микроскопом наблюдаются клетки различных форм: удлинённые, овальные, кривые и согнутые. Их цитоплазматические органоиды свободно расположены по всей клетке. Точно такая же картина наблюдается и у клеточных линий, устойчивых к 2,0 % NaCl, т.е. они подтверждают то, что при экстремальных солевых условиях растворённые соли, попав внутрь каждой клетки, сжимают к центру её цитоплазму. При пересадке клеток, выращенных в солевых условиях, в нормальную среду, многие из них принимают свою первоначальную форму. На рис. 69 показана нормально делящаяся клетка линии, устойчивой к 2,0 % NaCl.

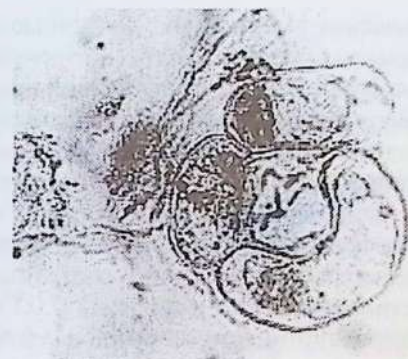


Рис. 68. Клетки линии, устойчивые к 1,4 % NaCl (увеличение x 300)



Рис. 69. Клетка линии, устойчивой к 2,0 % NaCl (увеличение x 300)

Таким образом, эти наблюдения показали, что клетки, выращенные в солевых условиях, при пересадке их в среду без NaCl возвращаются в своё нормальное морфологическое состояние.

Чтобы доказать, что полученные клетки действительно устойчивы к засолению, их изучали в различных солевых средах. Из каждой группы клеток на искусственной питательной среде изучали в среднем по 2-2,5 грамма каллусных клеток. В этом опыте, кроме контроля, в среду MS добавляли 5 различных концентраций NaCl и изучали на агаровой среде без фитогормонов. Исследования проводили в 4-кратной повторности. Они показали, что каллусные клетки контрольного варианта растут хорошо, они мясистые, комкообразные, бледно-зелёного цвета. При культивировании, в период роста отдельные участки каллусных клеток приобретают бледно-кремовый цвет и на них наблюдается формирование глобу-

лярных соматических эмбрионидов. Клеточные линии, устойчивые к NaCl, в нормальных условиях растут значительно медленнее, чем контрольный вариант. Все клеточные линии имеют кремовый цвет, нижняя часть каллусных клеток имеет водянистую структуру, верхняя — сухую, комкообразную. В течение нескольких субкультур клеточные линии сохраняли прежнюю окраску и не переходили к интенсивному росту. При культивировании на агаризованной среде с 0,5 % NaCl у всех клеточных линий определённых отклонений от нормы не наблюдалось. Даже контрольный вариант не реагировал на присутствие 0,5% NaCl в среде.

При культивировании клеток в среде с 1,0 % NaCl наблюдается следующая картина. Клетки контрольного варианта начинают отставать в росте, приобретая твёрдую структуру, их поверхность покрывается белым налётом. Основная масса приобретает серый цвет. А клеточные линии, устойчивые к 1,0 % NaCl в этой среде растут нормально, но со значительным уплотнением массы каллусных клеток, имея при этом кремовый цвет. Клеточные линии, устойчивые к 1,4 и 2,0 % NaCl в рассматриваемом варианте среды растут нормально, у них мягкая комкообразная структура бледно-кремового цвета.

При культивировании каллусных клеток в среде с 1,5 % NaCl у контрольного варианта рост прекращается. Каллусные клетки постепенно приобретают тёмно-коричневый цвет и к 30-му дню культивирования полностью высыхают. Клеточные линии, устойчивые к 1,0 % NaCl начинают отставать в росте, приобретая тёмно-кремовый цвет, на поверхности массы наблюдается рост клеток с белым налётом. При культивировании в этой среде клеточных линий, устойчивых к 1,4 % NaCl, наблюдается незначительное отставание в росте, при этом масса каллусных клеток имеет уплотнённую комкообразную структуру кремового цвета. На этой же среде каллусные клетки, устойчивые к 2,0 % NaCl растут хорошо с незначительным отставанием в росте, имея комкообразную структуру кремового цвета.

На питательной среде с 2,0 % NaCl у контрольного варианта рост не наблюдается и, за счёт присутствия высокой концентрации NaCl, клетки начинают высыхать. В этой среде у каллусных клеток, устойчивых к 1,0 % NaCl, также не наблюдается роста, и через определённое время клетки, приобретая тёмно-коричневый цвет,

начинают высыхать. В присутствии 2,0 % NaCl в среде у клеточной линии, устойчивой к 1,4 % NaCl, наблюдается значительное отставание в росте, масса каллусных клеток имеет твёрдую структуру и кремовый цвет. В отличие от других вариантов, клеточные линии, устойчивые к 2,0 % NaCl, в присутствии высокой концентрации соли (2,0 %) незначительно отстают в росте. Здесь необходимо отметить, что высокая концентрация соли в среде приводит к затвердению массы каллусных клеток.

Культивирование всех клеточных линий на средах с высоким содержанием NaCl (3,0 %) показало, что клетки быстро прекращают рост и многие линии (устойчивые к 1,0; 1,4 % NaCl), очень быстро высыхают. Такая высокая концентрация является губительной даже для клеточных линий, устойчивых к 2,0 % NaCl.

В табл. 37 даны результаты роста массы каллусных клеток у различных устойчивых клеточных линий в средах с различной концентрацией NaCl. Как видно, в цифровом значении в отличие от контрольного варианта каллусные клетки всех 3-клеточных линий в нормальной среде растут значительно медленнее, чем клетки контрольного варианта. Здесь возможно несколько версий, одна из которых — при культивировании клеток отселектировались медленно растущие, устойчивые к высоким концентрациям NaCl. Установлено также, что клеточные линии, устойчивые к высоким концентрациям NaCl (1,4; 2,0 %), даже в присутствии 2,0 % соли в среде растут и увеличиваются в массе. Таким образом, из проведённых в этом варианте исследований видно, что клеточные линии, устойчивые к NaCl, полученные путём селектирования в суспензионной среде при дальнейшем субкультивировании в средах с NaCl нормально росли и развивались.

В результате исследований после того, как на основе наших опытов мы убедились, что полученные нами клеточные линии оказались устойчивыми к NaCl, мы начали работы по получению из них регенерантов.

Как отмечалось, у клеток хлопчатника соматический эмбриогенез можно достичь в среде *MS* с витаминами B-5 *Gamborg* без фитогормонов. Клеточные линии в течение 30 дней культивировали в этой среде несколько раз, однако ни в одном из случаев не удалось добиться соматического эмбриогенеза. После этого, полагая, что один из экзогенных фитогормонов, действуя

на солеустойчивые клеточные линии, препятствует началу у них соматического эмбриоидогенеза, мы изучили культуру этих линий в средах с добавлением различных фитогормонов. Здесь необходимо отметить, что солеустойчивые линии также были получены из каллусных клеток сорта *Coker-312*, обладающего эмбриогенными качествами. Для проведения исследований в среду *MS* добавляли фитогормоны по отдельности и в различных сочетаниях в нескольких концентрациях. Схема фитогормонов была следующей (мг/л):

ИУК – 0,1; 0,5; 1,0; 2,0;

НУК – 0,05; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0;

2,4-Д – 0,05; 0,1; 0,5; 1,0;

кинетин – 0,1; 0,5; 1,0; 2,0;

Дропп – 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1,0;

ИУК : кинетин – 0,1 : 1,0; 1,0 : 1,0; 1,0 : 2,0;

НУК : кинетин – 0,1 : 0,1; 0,1 : 1,0; 1,0 : 1,0; 1,0 : 2,0;

НУК : БАП – 0,1 : 0,1; 0,1 : 1,0;

НУК : Дропп – 0,1 : 0,01; 0,1 : 0,1; 0,1 : 0,5; 1,0 : 0,5, т.е. состояла из 35 различных вариантов. Опыт проводили в 4-кратной повторности, в каждую колбу вносили приблизительно одинаковое количество массы каллусных клеток. Результаты изучали визуальным наблюдением. За ростом каллусных клеток контрольного варианта и 3 солеустойчивых линий наблюдали в течение 30 дней культивирования.

Исследования показали, что в присутствии ИУК в среде в количестве 0,1 мг/л в контрольном варианте ускорение роста массы не наблюдалось, каллусные клетки оставались светло-зелёного цвета и через 15-18 дней на различных их участках начали образовываться соматические эмбриониды. В этой среде у клеточных линий не было заметно никаких изменений, ни в скорости роста, ни в изменении цвета, т.е. у них сохранился светло-кремовый цвет и средняя скорость роста клеток. При повышении концентрации фитогормона до 0,5 и 1,0 мг/л существенной разницы в росте каллусной массы в контрольном варианте не наблюдалось, однако соматические эмбриониды не образовывались. Такие же результаты получены и при концентрации ИУК 2,0 мг/л. В этих средах в росте каллусных клеток солеустойчивых линий существенных изменений не наблюдалось. Лишь при добавлении в среду 2,0 мг/л ИУК отмечалось замедление роста клеток.

Таблица 37

Рост массы каллусных клеток в средах с NaCl у различных клеточных линий хлопчатника

Вариант среда с различной концентра- цией NaCl	Клеточные линии, устойчивые к NaCl									
	Контроль		1,0 %				1,4 %			
	в день посева, г	через 30 дней, г	увели- чение массы, %	увели- чение массы, %	увели- чение массы, %	увели- чение массы, %	увели- чение массы, %	увели- чение массы, %	увели- чение массы, %	увели- чение массы, %
Контроль	2,61	9,50	364	211	2,33	4,72	2,02	2,26	5,17	229
0,5 %	2,24	8,64	286	217	2,55	4,04	221	2,05	5,45	266
1,0 %	2,54	3,83	151	204	2,34	4,78	189	2,32	5,06	218
1,5 %	2,20	1,62	-	161	2,14	3,44	164	2,16	4,10	190
2,0 %	2,35	1,57	-	-	2,08	1,47	122	2,30	3,91	170
3,0 %	2,54	1,20	-	-	2,54	1,37	-	2,25	1,60	-
HCP ₀₁			9,4	6,2			7,7			3,9
HCP ₀₁			15,5	23,04			10,7			5,5

При изучении сред с участием α -НУК в концентрации 0,05 и 0,1 мг/л было заметно значительное ускорение роста клеток в контроле. На 15-20-й день культивирования начали образовываться глобулярные соматические эмбриониды, которые, к сожалению, не переходили в следующие стадии развития (сердечковидная, форма лотоса, гребешкообразного семядольного листа). В данном случае мы видим отрицательное действие экзогенных фитогормонов на формирование соматических эмбрионидов у клеток хлопчатника.

При добавлении в среду 0,5 мг/л НУК наблюдается значительное уменьшение количества соматических эмбрионидов в контрольном варианте. В данных условиях, по сравнению со средой без фитогормонов, заметно ускоряется рост каллусной массы. Появление соматических эмбрионидов в контроле при наличии в среде 1,0 и 2,0 мг/л НУК не наблюдалось. Содержание в среде 0,05; 0,1 и 0,5 мг/л НУК способствовало хорошему развитию клеток солеустойчивых линий. Они приобретали бледно-кремовую окраску, имея при этом мягкую комкообразную структуру. Образования соматических эмбрионидов здесь также не наблюдалось. Дальнейшее повышение концентрации НУК замедляет рост каллусной массы этих линий.

Изучение действия 2,4-Д показало, что даже низкие его концентрации практически останавливают образование соматических эмбрионидов. Этот фитогормон замедляет рост каллусных клеток солеустойчивых линий даже в контрольном варианте и меняет их цвет до бледно-кремового.

Наблюдение роста клеток в среде с использованием кинетина показало, что во всех 4-х вариантах при концентрации 0,1 и 0,5 мг/л наблюдается рост твердых каллусных клеток. В присутствии 0,1 мг/л кинетина у контрольного варианта на отдельных участках наблюдается формирование соматических эмбрионидов размером 0,8-1,0 мм, а при высоких концентрациях кинетина (1,0-2,0 мг/л) соматический эмбрионидогенез не наблюдается. Присутствие этого фитогормона в различных концентрациях в питательной среде не способствует формированию соматического эмбрионидогенеза у клеточных линий.

Дропп, входящий в группу цитокининов, при низких концентрациях (0,01; 0,05 мг/л) способствует усилению роста каллусных клеток у контрольного варианта, клетки приобретают зелёный цвет и мягкую комкообразную структуру, но при этом теряется способ-

ность их к формированию соматических эмбрионидов. Каллусные клетки 3-х солеустойчивых линий в среде, содержащей Дропп в этих же концентрациях, растут интенсивно и приобретают бледно-зелёный цвет. Здесь также не наблюдается формирование соматических эмбрионидов. Высокие же концентрации этого фитогормона (0,5-1,0 мг/л) затормаживают рост каллусных клеток во всех вариантах клеточных линий.

Из изученных сочетаний фитогормонов лишь смеси НУК : кинетин и ИУК : Дропп в низких концентрациях в контрольном варианте способствовали интенсивному росту массы каллусных клеток, а формирование соматических эмбрионидов наблюдалось лишь при использовании смеси НУК : кинетин (0,1:0,1 мг/л). Остальные смеси фитогормонов не оказали положительных результатов по формированию соматических эмбрионидов. Таким образом, изучение влияния различных фитогормонов и их концентраций на формирование соматических эмбрионидов у клеточных линий показало, что экзогенные фитогормоны оказались неспособными вызывать соматический эмбрионидогенез у полученных новых клеточных линий, устойчивых к засолению.

После проведённых экспериментов мы ещё раз убедились в том, что на каллусных клетках сорта *Coker-312* соматический эмбрионидогенез можно получить, в основном, на искусственной питательной среде с витаминами без фитогормонов. Возможно, присутствие фитогормонов в среде способствует более интенсивному делению клеток хлопчатника, однако, блокирует их морфогенетическое развитие.

В дальнейшем каллусы 3-х солеустойчивых клеточных линий хлопчатника продолжали культивировать на среде *MS* с витаминами *B-5 Gamborg* без фитогормонов. Они субкультивировались каждые 20-30 дней в течение 2-х лет. Однако, несмотря на это, образование соматических эмбрионидов на каллусах этих линий не происходило.

9.3. Проведение клеточной селекции на солеустойчивость

Как отмечалось, существует множество работ по соматическому эмбриогенезу у культурных и лекарственных растений, в которых указывается зависимость эмбриогенеза *in vitro* от генотипа и экс-

планта [221, 229, 263]. В частности, при проведении многочисленных исследований в этом плане на хлопчатнике, лишь в единичных случаях удавалось получить соматический эмбриогенез. Так, А.А.Абдукаримов и др. [7] наблюдали стабильный эмбриогенез на каллусных клетках дикого вида *G.klotzschianum*. J.N.Davidonis и R.Hamilton [231], изучая каллусогенез у нескольких групп сортов американской селекции, выделили сорта *Coker-201* и *Coker-312* как высокоэмбриогенные генотипы. В последующем N.L.Trolinder и J.P.Goodin [331] также отметили эмбриогенную способность каллусных клеток сортов *Coker*. Исследования, проведённые R.C.Shoemaker и др. [314] подтверждают, что в соматическом эмбриогенезе очень высока роль генотипа.

На основании разработанных нами методик по получению эмбрионидов и солеустойчивых клеточных линий *Coker-312* в задачу наших дальнейших исследований входило выявление среди районированных и перспективных сортов хлопчатника местной селекции эмбриогенноспособных, на каллусных клетках которых можно будет проводить исследования по клеточной селекции на солеустойчивость. Это, в свою очередь, даст возможность получить солеустойчивые линии, которые в дальнейшем могут быть использованы в качестве исходного материала для практической селекции.

Исходя из проведённых ранее исследований [257] индукцию каллусогенеза у хлопчатника получали из гипокотилей 8-10-дневных проростков. В качестве среды для индукции каллусогенеза и субкультивирования каллусных клеток использовали среду MS с фитогормонами НУК (1,0 мг/л) + кинетин (0,1 мг/л) и 3 % глюкозой. Объектом исследований служили сорта отечественной селекции вида *G.hirsutum* L.: Омад, С-6524, Наманган-77, С-9076, С-9070, С-2609, Аккурган-2, 108-Ф и Ташкент-6.

Исследования показали, что каллусные клетки в суспензии имели различную форму – чаще удлинённую, наблюдалось скопление нескольких каллусных клеток в небольшие агрегаты. Оболочка клеток была нормальная, особых нарушений в росте клеток не наблюдалось.

Вторую субкультуру проводили через 20 дней на той же питательной среде. Каллусные клетки пропускали через марлю, супернатант далее не использовался. После культивирования этой

субкультуры суспензия приобретала тёмно-коричневый цвет, наблюдалось уплотнение массы каллусных клеток в среде, но без образования крупных агрегатов клеток.

После второй субкультуры каллусные клетки отфильтровывали через капроновое сито, супернатант высевали на агаризованную питательную среду, состоящую из элементов среды MS с витаминами В-5 *Gamborg* без фитогормонов. Масса каллусных клеток всех изучаемых сортов на данной среде приобретала тёмно-коричневую окраску. В первые два месяца культивирования на среде не образовывалось каллусных клеток. В четвёртом пассаже наблюдалась та же картина. Видимо это был период адаптации каллусных клеток к новым условиям (переход из суспензии на твёрдую среду). Лишь на третий месяц культивирования из различных участков каллусов наблюдалось образование новых клеток, различных по массе и окраске в зависимости от изучаемого сорта (генотипа) (табл. 38).

При дальнейшем культивировании на морфогенной среде образование эмбриоподобных структур жёлто-зелёного цвета, глобулярной формы было отмечено на каллусных клетках сортов С-9076 и 108-Ф, но лишь в отдельных (2-3 колбах) случаях. Данные эмбриониды были перенесены на морфогенную среду. Однако дальнейшего их развития не наблюдалось и они постепенно некротизировали.

Несмотря на то, что не удалось добиться дальнейшего развития эмбрионидов, можно сделать заключение, что среди сортов местной селекции выделены эмбриогенноспособные – 108-Ф и С-9076. Исследования по регенерации растений хлопчатника из эмбрионидов и клеточной селекции на устойчивость к стрессфакторам внешней среды продолжаются.

Обобщая результаты проведённых исследований, можно сделать вывод, что несмотря на сходство морфо-биологических признаков изученных нами сортов вида *G.hirsutum* L., их диаллельное скрещивание доказало значительную генетическую отдалённость американского сорта *Coker-312* от отечественных сортов С-4727 и С-6524.

Кроме того, установлено, что у всех сортов каллусные клетки из гипокотилей хлопчатника хорошо индуцируются на среде MS с низкой концентрацией ауксинов, дальнейшее же их субкультивирование необходимо проводить без фитогормонов. Длительное

субкультивирование каллусных клеток хлопчатника на агаризованной среде не приводит к соматическому эмбриоидогенезу. Это удается получить на каллусных клетках эмбриогенноспособного сорта *Coker-312* только в условиях суспензионной среды при двухкратном субкультивировании с дальнейшим переводом клеток на агаризованную морфогенную среду без фитогормонов.

Таблица 38

Морфология каллусных клеток различных сортов хлопчатника

№	Сорта	Характеристика каллусных клеток
1.	Омад	Структура рыхлая, водянистая. Цвет кремовый, различных оттенков
2.	C-6524	Структура рыхлая, светло-бежевого цвета со светло-коричневыми уплотнениями
3.	Наманган-77	Структура более плотная, цвет бежевый и коричневый
4.	C-9076	Структура рыхлая, цвет бежевый с розовыми оттенками, некоторые участки светло-зелёного цвета
5.	C-9070	Структура рыхлая, ярко-зелёного цвета со светлыми участками
6.	C-2609	Структура рыхлая, зелёного цвета
7.	Аккурган-2	Структура плотная, цвет бурый
8.	108-Ф	Структура рыхлая, зелёного цвета со светлыми участками
9.	Ташкент-6	Структура рыхлая, водянистая, кремового цвета

Опыты подтвердили, что на искусственной питательной среде соматические эмбриониды имеют различные формы и размеры. Отсутствуют упорядоченность формирования семядольных листьев и типичные центры полярной организации, нарушена нормальная организация главного корня. Соматические эмбриониды на искусственной питательной среде переходят к автономному развитию со стадии формирования гребешкообразного семядольного листа и притупленного корешка (в стадии «клатос»), когда в их структуре наблюдаются хорошо развитые проводящие ткани. В условиях засоления до 1,0 % NaCl наблюдается индукция каллусогенеза из

гипокотилия хлопчатника. Дальнейшее повышение концентрации NaCl ингибирует каллусогенез из тканей гипокотилия.

Результаты исследований показали, что в суспензионных условиях каллусные клетки хлопчатника способны выдерживать относительно высокие концентрации NaCl (до 2,0 %). При этом в засоленных средах они приобретают овально-округлую форму, их размеры уменьшаются, количество резко сокращается. Под влиянием NaCl содержимое клетки становится прозрачным, цитоплазматические органеллы скапливаются и располагаются в различных частях цитоплазмы. Несмотря на высокие концентрации NaCl в суспензионной среде (1,4-2,0 %) встречаются отдельные клетки, сохранившие нормальную морфологическую структуру и способность к делению.

Из способов культивирования, суспензионный даёт возможность отселектировать клетки, устойчивые к значительно высоким концентрациям засоления и получения клеточных линий хлопчатника.

Отмечено, что при пересадке устойчивых клеточных линий на морфогенную агаровую среду, они способны восстановить свою морфологическую структуру, однако, при длительном субкультивировании не переходят к морфогенному развитию.

Основываясь на данных, полученных в процессе выполнения исследований, для получения соматического эмбриоидогенеза у сортов вида *G.hirsutum* L. можно рекомендовать индуцирование каллусных клеток в среде MS с 2,4-Д (0,1 мг/л). Дальнейшее же субкультивирование необходимо проводить без фитогормонов. Для получения соматических эмбрионидов требуется неоднократное субкультивирование массы каллусных клеток в суспензионной среде без фитогормонов, после чего их следует перенести в агаризованную среду MS с витаминами B-5 *Gamborg* без фитогормонов. Для получения клеточных линий *G.hirsutum* L., устойчивых к хлоридному засолению, клеточную селекцию в суспензионной среде можно начинать с 1,0; 1,5 и 2,0 % NaCl.

ГЛАВА 10

РЕЗУЛЬТАТЫ ИЗУЧЕНИЯ НОВЫХ ЛИНИЙ ХЛОПЧАТНИКА ПО ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫМ ПРИЗНАКАМ И НА СОЛЕУСТОЙЧИВОСТЬ

Как известно, хлопкосеющие области нашей республики по почвенно-климатическим условиям сильно отличаются друг от друга. Это, в свою очередь, ставит перед селекционерами задачу создания сортов, приспособленных к определённым условиям возделывания. На сегодняшний день наиболее актуальна проблема создания сортов хлопчатника, устойчивых к почвенному засолению. При создании данных сортов, в первую очередь, следует правильно подбирать первичный материал, т.е. в качестве доноров использовать солеустойчивые сорта. Только в этом случае можно добиться ожидаемого результата.

Изменение условий возделывания сортов, в частности, освоение новых посевных площадей в других экологических зонах, изменение экологической обстановки, усовершенствование агротехники возделывания хлопчатника и т.д. требует постоянного обновления сортов.

В настоящее время требованием современности является поиск возможностей использования засоленных и засушливых земель. Вместе с тем, выведение новых соле- и засухоустойчивых сортов даст возможность эффективного использования земель с различной степенью засоления и малой водообеспеченностью.

На протяжении ряда лет многие ученые в поисках путей повышения урожайности и качества получаемой продукции на подверженных засолению землях проводили научные исследования в различных регионах. Так, М.Абуталибов [12] указывает на то, что всхожесть семян хлопчатника, высеянных в первый год на засоленных землях, задерживается на 7-10 дней за счёт влияния на них вредных солей. Особенно это влияние проявляется на начальном развитии и в фазе бутонизации хлопчатника, что ведёт в некоторых случаях к высыханию растений.

По мнению некоторых исследователей [174], на засушливом фоне наследование признаков у гибридов первого поколения зависит от генотипических особенностей родителей и их приспособленности к окружающей среде.

Х.Мунасов и др. [129], изучая некоторые линии, выращенные на засушливом фоне в условиях засоления, выделили высокоурожайные линии, устойчивые к вышеуказанным факторам по сравнению со стандартными сортами.

Как указывалось в предыдущих разделах, хлопчатник возделывается, в основном, для получения волокна, а наша республика по экспорту волокна стоит на 2 месте среди мировых производителей. Это, в свою очередь, требует изыскания возможностей производства более качественного волокна исходя из почвенно-климатических условий каждого региона. Для этого необходимо разработать агротехнические мероприятия, влияющие на качество волокна с учетом плодородия почв и их степени засоления. Известно, что засоление отрицательно влияет не только на урожайность той или иной культуры, но и на качество продукции. Из исследований, проводимыми в этом направлении, известно, что повышение степени засоления почв укорачивает длину волокна на 5,2 мм, отрицательно влияет на его качество. В связи с этим в условиях почв, склонных к засолению, поиск возможностей производства качественного волокна является актуальной проблемой современной селекции.

Для решения этой проблемы необходимо развивать работы по экологической селекции. Здесь следует отметить, что большое значение имеет подбор и выведение сортов и гибридов, способных давать высококачественное волокно в различных регионах.

Ряд исследователей [130] изучали качество волокна созданных ими линий, выращенных на засоленных землях в условиях Сырдарьинской области, в результате чего среди них были отобраны такие, которые превышали стандартные сорта (Ан-Баяут-2, Наманган-77, С-6524) по таким признакам как длина волокна, его крепость и микронейр.

О.Кучкаров и др. [114] изучали качество волокна новых линий хлопчатника, созданных в условиях сильного засоления. В опыте в условиях Сырдарьинской области были испытаны несколько линий и гибридных комбинаций. Результаты исследований показали, что в этих условиях родительские пары, участвующие в скрещивании, способны передавать потомству как качество волокна, так и другие хозяйственно-ценные признаки.

Из приведенных данных видно, что у сортов хлопчатника в различных почвенно-климатических условиях урожайность и качество волокна проявляются по-разному. Следовательно, районированные сорта и перспективные линии в различных почвенно-климатических условиях не могут полностью проявить свои хозяйственно-ценные признаки. В связи с этим большое значение в сельском хозяйстве имело, и будет иметь всестороннее изучение сортов хлопчатника в определённых условиях выращивания, а также размещение их по продуктивности и его качеству.

Поэтому селекционный процесс необходимо направить на создание сортов, устойчивых к экстремальным факторам окружающей среды (заболевание вилтом, недостаток или избыток влаги, засоление почв и другие), обладающих комплексом хозяйственно-ценных признаков, с высоким качеством волокна и семян. Для этого требуется проводить селекционные работы в условиях засоления почв и других неблагоприятных факторах среды; изучение и испытание линий хлопчатника, выделение среди них наиболее устойчивых и внедрение их в производство.

Опыты проводились в «Экспериментальном хозяйстве» Ташкентского государственного аграрного университета и Сырдарьинском филиале Узбекского научно-исследовательского института хлопководства (ЦОМС). В исследованиях принимали участие сорт Умид и 3 линии, полученные ранее. В качестве стандартных были взяты сорта С-6524, Наманган-77 и АН-Баяут-2, занимающие основные посевные площади в Ташкентской и Сырдарьинской областях. Семена были высеяны во второй декаде апреля по схеме 90х15-1 в 3-4-кратной повторности. Посев семян производился вручную. Густота стояния растений в поле составила в среднем 72 тыс. шт./га. Все агротехнические мероприятия проводились по методикам, общепринятым в данном хозяйстве. Перед сбором урожая с каждой повторности опыта были собраны 25-коробочные пробы. По ним в лаборатории были определены масса коробочки, выход и длина волокна, остальные технологические показатели определялись на аппарате «HVI Motion».

Кроме того, эти же сорта и линии были высажены в УзНИИ хлопководства в условиях лизиметра в 3-кратной повторности.

Как известно, между количеством коробочек на растении и их крупностью существует отрицательная корреляция. Это значит, что чем крупнее коробочки, тем меньшее количество их на растении. Поэтому выведение сортов с крупностью коробочки 8,0-8,5 г считается неэффективным, так как чаще всего такие сорта по длине вегетационного периода склоняются к позднеспелым. Особенно это наблюдается у сортов хлопчатника, возделываемых на засоленных почвах.

Например, Н.Пуллатов [148], на основе проведённых пятилетних исследований, пришёл к выводу, что при посеве семян на засоленные почвы в первый и второй годы вегетационный период растения, по сравнению с чистым фоном, увеличился на 7-10 дней. При возделывании сортов Ташкент-1 и 108-Ф в условиях засоления в течение 4-5 лет их скороспелость и урожайность ощутимо возросла, особенно у сорта Ташкент-1.

При изучении нами основных хозяйственно-ценных признаков хлопчатника обнаружено различие в проявлении признака массы одной коробочки, т.е. неблагоприятная солевая среда действовала на данный признак неодинаково (табл. 35). Так, при выращивании хлопчатника на засоленной почве, по сравнению с чистым фоном, крупность коробочки у стандартных сортов С-6524, Наманган-77 и АН-Баяут-2 уменьшилась соответственно на 0,6; 0,7 и 0,4 г, а у изучаемого сорта Умид и 3-х линий - Л-6, Л-13 и Л-198 соответственно на 0,3; 0,3; 0,2 и 0,2 г. Полученные данные показали относительную устойчивость данных линий по сравнению со стандартными сортами.

При изучении урожайности линий хлопчатника было обнаружено, что независимо от фона выращивания (засоленный и незасоленный) урожайность линий была намного выше стандартных сортов (10-14 ц). Однако, несмотря на это, засоленная среда негативно влияет на данный признак. Здесь следует отметить, что сорт Умид к их числу не относится, поскольку засоленная среда отрицательно не сказалась на его урожайности. Наоборот, на засоленном фоне данный сорт показал наилучшие результаты не только по сравнению со стандартными сортами, но и относительно других изученных линий. Это свидетельствует о том, что сорт Умид является устойчивым к почвенному засолению в данных условиях (табл. 39).

Таблица 39

Масса одной коробочки и урожайность хлопчатника на
засолённых и незасолённых почвах

Сорт и линия	Масса одной коробочки, г			Урожайность, ц/га		
	незасо- лённый фон	засолён- ный фон	раз- ница	незасо- лённый фон	засолён- ный фон	раз- ница
С-6524	5,6	5,0	-0,6	34,1	30,9	-3,2
Наманган-77	5,2	4,5	-0,7	36,4	32,2	-4,2
Ан-Баяут-2	5,5	5,1	-0,4	39,0	38,0	-1,0
Умид	5,7	5,4	-0,3	44,1	44,4	+0,3
Л-6	6,3	6,0	-0,3	40,5	40,0	-0,5
Л-13	5,6	5,4	-0,2	42,5	41,7	-0,8
Л-198	5,6	5,4	-0,2	45,7	44,1	-1,6

У остальных сортов и линий (С-6524, Наманган-77, Ан-Баяут-2, Л-6, Л-13 и Л-198) наблюдалось понижение данного признака соответственно на 3,2; 4,2; 1,0; 0,5; 0,8; 1,6 ц. Полученные данные ещё раз доказали, что засоленная среда негативно влияет на накопление урожая у хлопчатника.

Эти же сорта и линии были изучены в малом сортоиспытании. Основная цель данного опыта – определение разницы между всеми изучаемыми сортами и линиями по основным хозяйственно-ценным признакам в почвенно-климатических условиях области. Показатели сравнивались со стандартными сортами С-6524 и Наманган-77.

Таблица 40

Урожайность новых линий в малом сортоиспытании

Сорта и линии	Урожайность по повторностям, ц/га				Разница	
	1	2	3	сред- нее	Наманган- 77	С-6524
Наманган-77	36,0	36,5	36,8	36,4	-	-
С-6524	33,5	34,0	35,0	34,1	-	-
Умид	45,0	43,3	44,0	44,1	+7,7	+10,0
Л-6	40,1	35,3	40,0	38,5	+2,1	+4,4
Л-13	41,5	42,1	41,5	41,7	+5,3	+7,6
Л-198	42,5	43,0	42,1	42,5	+6,1	+8,4

Как видно из результатов, приведенных в табл. 40, сорт Умид по урожайности хлопка-сырца намного превышает остальные изучаемые линии и стандартные сорта. Вместе с тем, показатели линий Л-6, Л-13 и Л-198 также оказались выше стандартного сорта Наманган-77 на 2,1; 5,3; 6,1 ц/га соответственно. При сравнении со стандартным сортом С-6524 показатели этих 3-х линий превышали его на 4,4-8,4 ц/га. Анализ вышеуказанных данных свидетельствует о том, что урожайность линий в этих условиях превосходила стандартные сорта, особенно сорт С-6524. По результатам проведённых опытов мы считаем, что с сортом Умид и линиями Л-6, Л-13 и Л-198 необходимо продолжать селекционно-семеноводческую работу.

Как известно, выход и длина волокна считаются основными хозяйственно-ценными показателями сортов хлопчатника и тесно связаны с другими качественными и количественными признаками, такими как скороспелость, урожайность и др.

Поскольку Узбекистан является одним из основных экспортёров хлопкового волокна, то наряду с повышением выхода необходимо проводить работы и по улучшению его качества, чтобы оно полностью отвечало требованиям мирового рынка [14, 87, 133, 189].

Учитывая значимость вышеуказанных проблем, мы, в свою очередь, также проводили свои исследования по этим признакам.

Результаты опытов показывают, что солевая среда, по сравнению с незасолённой, влияет на выход и длину волокна как отрицательно, так и положительно. Например, у сортов С-6524, Наманган-77 и Умид, а также линий Л-13, Л-198, выращенных на засоленной почве, выход волокна увеличился на 1,8; 0,5; 0,8; 4,2 и 1,2 % соответственно (табл. 41). У сорта Ан-Баяут-2 этот показатель уменьшился на 0,5 %, а у линии Л-6 – на 1,1 %. Повышение выхода волокна, в этом случае, видимо, связано с тем, что солевая среда отрицательно повлияла на размер и массу семян.

Из полученных данных видно, что на длину волокна засоление также влияет по-разному. Если при выращивании растений на засоленной почве у сорта Наманган-77 и линии Л-13 длина волокна увеличилась, то у остальных сортов и линий (С-6524, Ан-Баяут-2, Умид, Л-6, Л-198) она уменьшилась на 0,6; 1,0; 3,6; 1,0; 1,7 мм соответственно (см. табл. 41).

Многие учёные селекционеры проводили и проводят свои ис-

следования в этом направлении. В частности, Ж.Шодмонов и др. [193] ставили опыты в Мирзачульском регионе с целью изучения влияния степени засоления почвы на качество хлопкового волокна, а также подбора новых и перспективных сортов и линий, приспособленных к данным условиям. Результаты проведенных ими исследований показали, что при выращивании растений на средnezасоленных почвах, по сравнению со слабозасоленными, длина волокна уменьшается на 0,4-3,2 мм. Высокорослые и позднеспелые сорта при этом оказались более устойчивыми к засолению. В процессе селекционных работ был выделен ряд линий (Л-1, Л-4, Л-8, Л-588 и Л-13), приспособленных к условиям Сырдарьинской области, а по качеству волокна отвечающих требованиям мирового рынка.

Таблица 41

Выход и длина волокна хлопчатника на засоленном и незасоленном фоне

Сорт и линия	Выход волокна, %			Длина волокна, мм		
	незасо- лённый фон	засо- лённый фон	раз- ница	незасо- лённый фон	засо- лённый фон	раз- ница
С-6524	35,6	37,4	+1,8	33,0	32,4	-0,6
Наманган-77	37,8	38,3	+0,5	31,6	32,4	+0,8
Ан-Баяут-2	35,0	34,5	-0,5	31,5	30,5	-1,0
Умид	38,5	39,3	+0,8	32,6	29,0	-3,6
Л-6	39,5	38,4	-1,1	35,0	34,0	-1,0
Л-13	36,7	40,9	+4,2	34,7	35,7	+1,0
Л-198	38,0	39,2	+1,2	32,8	31,1	-1,7

Технологические показатели стандартных сортов и изученных нами линий определяли также на аппарате HVI Motion. Как видно из полученных данных (рис. 70, 71, 72) засоление практически не повлияло на качество волокна. Относительная разрывная нагрузка сорта Умид была выше всех остальных и примерно равнялась показателю стандартного сорта С-6524, а по сравнению с другими стандартными сортами (Наманган-77, Ан-Баяут-2) она была выше на 4,5 и 5,1 гс/текс соответственно. Показания Л-6 были близки к таковым сорта Умид, однако у Л-13 этот показатель был ниже по сравнению с сортом Умид на 3,3 гс/текс, а у Л-198 – на 3,2 гс/текс. Длина волокна в дюймах среди изученных сортов и линий хлопчатника была наибольшей у сортов

С-6524, Умид и линий Л-6 и Л-13. По показателю микропейра отличались сорта С-6524, Наманган-77 и линии Л-6, Л-13. Как видно из данных таблиц, по всем технологическим свойствам волокна самые худшие показатели оказались у сорта Ан-Баяут-2.

На основе проведенных исследований можно сделать вывод, что средnezасоленные почвы влияют на сорта и линии неодинаково, поэтому возникает необходимость всестороннего изучения их в сильнозасоленных почвенных условиях.

Известно, что среди всех производимых в республике растительных масел хлопковое считается наиболее потребляемым и составляет около 70-75 % от общего количества масел, потребляемого населением. Поэтому, наряду с другими основными хозяйственно-ценными признаками, повышение содержания масла в семенах новых выводимых сортов хлопчатника и внедрение их в производство является актуальной задачей сегодняшнего дня.

Количество масла в семенах хлопчатника непосредственно влияет на такие признаки как энергия прорастания, всхожесть, их массу и другие показатели. Вместе с тем, чем больше содержание масла в семенах, тем выше их сопротивляемость к неблагоприятным факторам окружающей среды. Поэтому, при подборе родительских пар для скрещивания рекомендуется уделять особое внимание массе 1000 штук семян и содержанию масла в них.

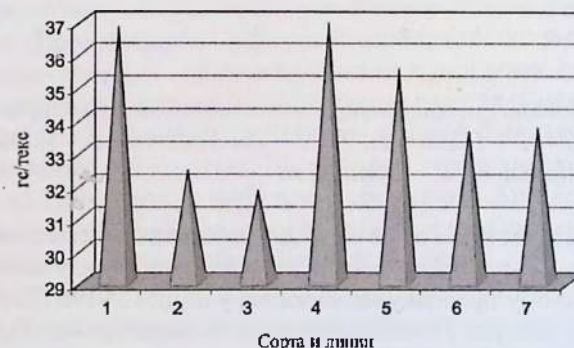


Рис. 70. Относительная разрывная нагрузка волокна новых линий на засоленном фоне

1 – С-6524; 2 – Наманган-77; 3 – Ан-Баяут-2; 4 – Умид; 5 – Л-6; 6 – Л-13; 7 – Л-198

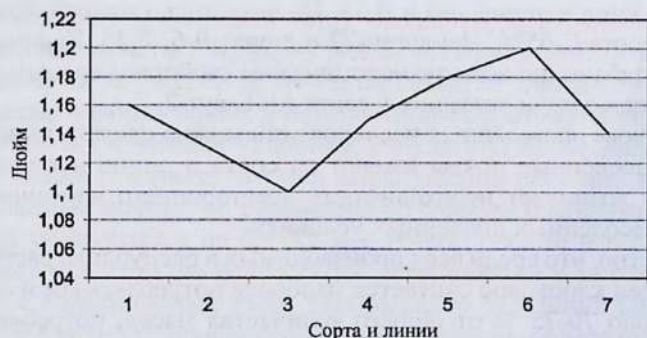


Рис. 71. Длина волокна новых линий на засоленном фоне
1 — С-6524; 2 — Наманган-77; 3 — Ан-Баяут-2; 4 — Умид; 5 — Лия-6; 6 — Лия-13; 7 — Лия-198



Рис. 72. Показатели микронейра новых линий на засоленном фоне
1 — С-6524; 2 — Наманган-77; 3 — Ан-Баяут-2; 4 — Умид; 5 — Лия-6; 6 — Лия-13; 7 — Лия-198

В связи с этим нами была определена масличность семян изученных сортов и линий. Результаты показали, что наилучший показатель по данному признаку наблюдался у линий Л-198 (25,6 %) и Л-13 (24,1 %). У сорта Умид масличность была на уровне 21,9 %.

Данные исследований, проведенных нами в этой области, показали, что и на содержание масла в семенах засоление влияет отрицательно. Так, если у Л-198 масличность семян на чистом фоне была 25,6 %, то при выращивании на средnezасоленных почвах она снизилась до 21,3 %. У линии Л-13 мы можем наблюдать такую же

картину, т.е. у неё идёт снижение показателей по этому признаку с 24,1 % до 21,2 %. Похожие результаты были получены и у всех остальных изученных сортов и линий.

Таким образом, по результатам проведенных опытов среди изученных сортов и 3-х линий можно выделить Л-13 и Л-198 как наиболее высокомасличные.

По данным УзНИИ хлопководства и др. урожайность хлопчатника при слабом засолении по сравнению с незасоленными землями уменьшается на 15-20 %, при среднем засолении — на 30-35 % и сильном засолении — на 70-80%. Подобные данные были получены Т.Кулиевым и И.Уразбаевым [111]. Результаты их исследований показали, что коэффициент доминантности по массе сырья 1 коробочки и продуктивности растения у гибридов хлопчатника колебался от 0 до 1, где наблюдалось неполное доминирование. Авторы показали, что в данных экстремальных условиях продуктивность растения уменьшается до 10-30 %.

Исходя из этого, остро стоит проблема улучшения отдачи земель с различной степенью засоления. Для этого необходимо создание новых сортов устойчивых к экстремальным факторам среды, в частности к засолению почв.

В связи с этим, в результате ранее проведенных исследований, были выделены перспективные линии (Л-6, Л-198, МС-5, МС-8) и создан сорт Умид, относительно устойчивые к почвенному засолению. Для определения их солеустойчивости на открытом грунте полученные линии и сорта испытывали в условиях лизиметра в 3-х кратной повторности в УзНИИ хлопководства. Средnezасоленные почвы для лизиметра были взяты с полей филиала УзНИИХ, расположенного в Гулистанском районе Сырдарьинской области. В качестве стандартных использовались сорта Ан-Баяут-2, занимающий основные посевные площади в Сырдарьинской области и С-6524, высевающийся в Ташкентской области.

Полевые опыты закладывались в соответствии с методическими указаниями «Методы агрохимических, агрофизических и микробиологических исследований в поливных хлопковых районах» [202] и «Методика полевых опытов с хлопчатником» [203].

Перед закладкой опыта в начале мая были взяты две почвенные пробы, для определения содержания питательных веществ, при анализе которых было обнаружено, что на глубине 0-30 см содер-

жание перегноя было 0,940 % и по мере углубления оно уменьшалось. Такие же данные получены и при определении азота и фосфора.

Определено содержание ионов Cl^- в почве на различной глубине. Анализы показали, что их количество в мае месяце было в пределах 0,036 %, а в сентябре оно составило 0,032 %. Видимо, какая-то часть солей, содержащихся в почве до закладки опыта, была смыта поливной водой в более глубокие горизонты, либо, часть растворённых в воде солей была усвоена растениями.

Для изучения роста и развития растений на засоленной почве проводили фенологические наблюдения в первых числах июня, июля, августа и сентября. Среди изученных сортов в первый месяц роста самой лучшей динамикой отличился сорт С-6524. К 1 июня высота его составила 12,0 см. За ним следует сорт Ан-Баяут-2 с высотой растения 11,9 см. Как видно, эти сорта по высоте в начальный период развития практически не отличаются друг от друга и превосходят другие изученные сорта и линии на 0,8-4,2 см. Следовательно, можно сказать, что эти сорта в период всхожести семян и начального роста относительно солеустойчивы. Такая тенденция роста сохранялась и в следующем месяце. Однако к 1 августа почти все линии и сорт Умид перегнали их по этому признаку. Отсюда можно сделать вывод, что темпы роста изученных линий резко возрастают во второй половине вегетационного периода, т.е., скорее всего, они способны приспосабливаться к экстремальным условиям произрастания.

По количеству симподиальных ветвей сорт Ан-Баяут-2 показал наилучшие результаты. Так, в частности, по данным на 1 июля этот сорт по числу симподий превосходил остальные линии на 0,5-3,4 шт. К 1 августа только Л-6 имела такой же результат, т.е. по 7,1 шт. симподий на растение. Другие же отстали на 0,8-1,7 шт. Наихудший результат по этому признаку наблюдался у линии МС-8. Если у сорта Ан-Баяут-2 количество плодовых ветвей 1 июля было 6,0 штук, то у линии МС-8 их было всего 2,6 шт. Видимо, это связано с тем, что, к этому времени, высота растений у этой линии была также ниже всех остальных линий и сортов. В частности, сорт Ан-Баяут-2 имел высоту 46,1 см, а линия МС-8 — 31,0 см, т.е. на 16,1 см ниже стандартного сорта.

При анализе количества плодозлементов на 1 июля наблюдается

примерно такая же картина. Однако в августе все изученные линии превосходили стандартные сорта по этому признаку, особенно Л-6, у которой на этот период количество плодозлементов составило 7,4 шт., тогда как у сорта С-6524 их было всего 6,3 шт. Показатели остальных линий и сортов были близки друг к другу (6,4-6,6 шт.).

Накопление коробочек, а также темпы их раскрытия, по данным на 1 сентября, было лучшим у 2 линий — МС-5 и МС-8 (12,7 и 11,9 штук соответственно), хотя в начале вегетации они значительно отставали в росте. По-видимому, это объясняется тем, что у данных линий темпы накопления плодозлементов и раскрытия коробочек выше остальных линий и сортов. Либо, это доказывает повышенную солеустойчивость этих линий.

Из вышесказанного следует отметить, что если в начальный период стандартные сорта Ан-Баяут-2 и С-6524 по росту и развитию превосходили изучаемые линии, то к середине вегетации они резко отстали. Это может свидетельствовать об устойчивости этих линий к почвенному засолению относительно стандартных сортов.

Урожайность определялась по трём повторениям. Густота стояния растений в среднем в лизиметре составляла 12,0-13,3 штук. По массе одной коробочки лидировали линии МС-8 и Л-6, у которых она составляла соответственно 5,2 г и 5,3 г при первом сборе, который проводился 31 августа и 4,9 г и 5,0 г при втором сборе, который проводился 25 сентября. Анализ данных показал, что среди всех изученных сортов и линий по урожайности можно выделить 3 линии, показатели которых были намного выше, чем у других, т.е. это МС-8, Л-6 и МС-5. Масса хлопка-сырца с лизиметра у них равнялась соответственно 592,5; 581,9 и 553,9 г/лизиметр. Урожайность же остальных была ниже 399,2 г/лизиметр.

Однако, если анализировать урожайность по двум сборам, то в данном случае линия Л-6 основной урожай дала при первом сборе (419,7 г/лизиметр). Обратная картина наблюдалась у линии МС-8, которая при первом сборе дала урожай 283,3 г/лизиметр, а при втором сборе 309,2 г/лизиметр, т.е. на 25,9 г/лизиметр больше, чем при первом сборе. Это говорит о том, что в данных условиях эта линия показала себя наиболее позднеспелой относительно других сортов и линий.

Таким образом, из проведённых в условиях лизиметра исследований можно сделать вывод, что по основным хозяйственно-

ценным показателям среди всех изученных линий и сортов выделились линии МС-5, МС-8 и Л-6, с которыми следует проводить дальнейшие исследования по селекции на солеустойчивость.

Сорт Умид

В результате исследований, проведённых нами в течение ряда лет по изучению, испытанию, выделению солеустойчивых, обладающих комплексом хозяйственно-ценных признаков линий хлопчатника, был выведен сорт Умид (рис. 73).

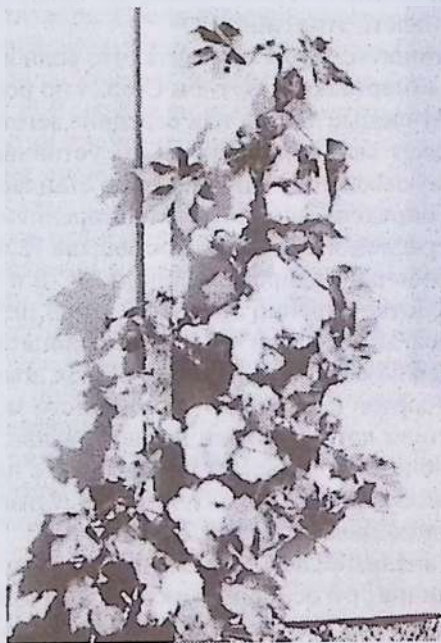


Рис. 73. Сорт Умид

Данный сорт был передан в грунтконтроль в 2005 г., где успешно прошёл все испытания. После этого он был принят в ГСИ и в данный момент испытывается в 7 областях республики. Это Ташкентская, Сырдарьинская, Джиззакская, Ферганская, Андижанс-

кая, Наманганская и Навоийская области. В 2008 г. сорт Умид высевался в Наманганской, Ферганской и Андижанской областях на общей площади около 30 га. В 2009 г. данный сорт высевается в элитно-семеноводческих хозяйствах Андижанской и Ташкентской областях на общей площади около 170 га.

Сорт был выведен в результате многократного индивидуального отбора в Ташкентском государственном аграрном университете из популяции сорта Истиклол. Его авторами являются М.Рахмонкулов, С.Рахмонкулов, Л.Гофурова, Н.Салиходжаев, А.Кидербаева, У.Жавлиев, А.Турсунов.

По продолжительности вегетационного периода он относится к группе среднеспелых сортов (110-125 дней). Куст пирамидальной формы с высотой 110-125 см, устойчивый к полеганию. Стебель и симподиальные ветви зелёного цвета, средне опушённые. Ветвление 1,5 типа, первая плодовая ветвь закладывается на 5-6 узле стебля. Лист среднего размера, 3-5-лопастной. Коробочка средняя – 5,2-5,8 г, эллипсовидной формы. Хлопок-сырец хорошо прикреплен к створкам коробочек, не осыпается. Масса 1000 штук семян 110-115 г, масличность семени – 20-22 %.

Сорт Умид даёт волокно IV типа, штапельная длина – 33-35 мм, волокно белого цвета, метрический номер – 6340, относительная разрывная нагрузка – 32,5 гс/текс, разрывная нагрузка – 4,4 гс, выход волокна – 38-40 %, показатель микронейра – 4,0-4,6. Устойчивость к заболеванию вертициллёзным вилтом на 10-15 % выше, чем у стандартного сорта С-6524. Средняя урожайность – 40-44 ц/га.

Качество волокна сорта определялось в Центре сертификации хлопкового волокна Республики Узбекистан (табл. 42).

Из данных, приведённых в табл. 42 видно, что здесь явно наблюдается прогресс в улучшении показателей качества волокна, в частности, микронейра, за счёт проведения качественных индивидуальных и посемейных отборов. Если в 2007 г. в среднем по повторностям показатель микронейра составлял 4,63, то к 2008 г. он был на уровне 3,95. Полученные результаты свидетельствуют о том, что выведенный сорт имеет большой потенциал не только по качеству волокна, но и по другим хозяйственно-ценным показателям, над которым необходимо работать в процессе его предварительного размножения.

Таблица 42
Данные Центра сертификации хлопкового волокна РУз по сорту Умид

Повтор-ности	Mic	Str	Len	Unf	SFI	Elg	T	Cnt	Area	CG	Rd	+b
2007 г.												
1	4,6	33,2	1,12	84,3	5,2	8,3	1	3	0,1	21-2	79,4	8,6
2	4,7	32,7	1,12	83,6	5,5	8,3	1	8	0,1	21-4	78,0	9,1
3	4,6	32,7	1,13	83,8	5,4	7,9	1	4	0,1	11-2	79,7	9,2
Среднее	4,63	32,9	1,12	83,9	5,4	8,2	1	5	0,1	18-3	79,0	8,9
2008 г.												
1	3,8	30,9	1,17	83,6	9,3	8,7	2	15	0,2	21-2	80,0	8,3
2	4,0	30,9	1,19	84,1	7,7	8,9	2	12	0,2	21-2	79,9	8,1
3	4,1	32,7	1,17	84,6	8,0	9,1	2	9	0,2	21-2	79,9	8,4
4	3,9	33,5	1,20	83,7	8,3	9,1	2	10	0,2	21-2	79,8	8,2
Среднее	3,95	32,0	1,18	84	8,3	8,9	2	11	0,2	21-2	79,9	8,2

Государственное сортоиспытание

В результате научных исследований выведенный нами сорт хлопчатника «Умид» испытывается на участках ГСИ с 2006 г. В процессе испытаний по всем годам сорт даёт стабильно хорошие результаты по основным хозяйственно-ценным показателям (табл. 43). В табл. 43 приведена 3-летняя урожайность сорта по сравнению со стандартными сортами. Из неё видно, что урожайность по годам и госсортоучасткам была различной, но во всех случаях количество урожая сорта Умид превосходило стандартные сорта. Так, в 2006 г. по Юкориичирчикскому участку ГСИ Ташкентской области сорт Умид показал урожайность 38,8 ц/га, тогда как у сорта С-6524 она была 29,8 ц/га, т.е. выведенный новый сорт превосходил стандартный на 9,0 ц/га. В том же году сорт высевался также в Избосканском ГСУ Андижанской области и превзошёл стандартный сорт Окдарё-6 на 12,2 ц/га.

Таблица 43

Урожайность сорта «Умид», ц/га

№	Испытуемые сорта	Государственные сортоучастки				
		Юкори-чирчик-ский (2006 г.)	Охунбо-бев-ский (2006 г.)	Избос-канский (2006 г.)	Курган-тепин-ский (2007 г.)	Избос-канский (2008 г.)
1.	С-6524 (ст.)	29,8	32,6		44,0	
2.	Наманган-77 (ст.)	36,2				
3.	Окда, 6-6 (ст.)			24,4		
4.	Андижан-35 (ст.)					42,6
5.	Умид	38,8	37,4	36,6	48,5	45,2

Подобные данные были получены и в 2007-2008 гг. В частности, в Кургантепинском ГСУ урожайность стандартного сорта С-6524 была 44,0 ц/га, а у сорта Умид – 48,5 ц/га, т.е. по сравнению со стандартом она была выше на 4,5 ц/га.

Анализ результатов энтомо-фитопатологического ГСУ Избосканского района Андижанской области показал, что сорт Умид превосходил стандартный сорт Окдарё-6 не только по урожайнос-

ти, но и по устойчивости к вилту. В частности, если у сорта Окдарё-6 общая заболеваемость вилтом была на уровне 44,0 %, то сорт Умид был поражён всего лишь на 29,8 % (табл. 44). По поражаемости вилтом в сильной степени он также показал себя более устойчивым.

Таблица 44

**Поражение вилтом сорта Умид на Избосканском
энтомо-фитоучастке**

№	Сорта	Заболеваемость вилтом, %	
		всего	из них в сильной степени
1.	Окдарё-6 (St)	40,8	16,1
2.	Умид	29,8	13,3

Аналогичные данные были получены и в ГСУ Охунбобоев Ферганской области. Здесь заболеваемость вилтом стандартного сорта С-6524 составила 30,0 %, а у сорта Умид – 28,0 %. Кроме того, по массе сырца одной коробочки сорт Умид также превосходил стандарт. Если у сорта С-6524 крупность коробочки была 4,2 г, то у сорта Умид она была 4,6 г, т.е. на 0,6 г выше.

На основании вышеизложенных данных можно сделать вывод, что в сегодняшних рыночных экономических отношениях выведенный сорт Умид представляет определённый интерес для сельского хозяйства нашей республики, т.к. по основным хозяйственно-ценным признакам, в частности, качеству волокна, урожайности хлопка сырца, устойчивости к вилту и к почвенному засолению он превосходит ныне высеваемые стандартные сорта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По прогнозам ученых к 2020 г. на Земле будет проживать более 9 миллиардов человек. В связи с этим остро стоит вопрос создания не только скороспелых, урожайных сортов растений, но и устойчивых к неблагоприятным внешним условиям, болезням и вредителям. Однако ресурсы увеличения производства продовольствия на традиционной основе будут исчерпаны в ближайшие 10-15 лет. Следовательно, необходимы принципиально новые подходы к изучению растений и нетрадиционные технологии повышения их продуктивности и качества урожая [112].

Решить вышеуказанные проблемы можно при широком использовании достижений биотехнологии, становление которой оказалось возможным благодаря фундаментальным знаниям и практическим разработкам. Так, в настоящее время получили широкое развитие такие методы биотехнологии, как преодоление нескрещиваемости при разнохромосомной гибридизации растений с использованием эмбриокультуры, культуры клеток и тканей, с помощью которых можно создавать первичный материал для селекции сельскохозяйственных растений. Однако эти методы на хлопчатнике сталкиваются с определенными трудностями методического и методологического характера.

Литературные и полученные нами данные свидетельствуют, что несовместимость при отдаленной межвидовой гибридизации растений проявляется, в основном, в сингамной фазе оплодотворения. Благодаря действию экзогенных фитогормонов представляется возможным регулирование нормального развития зародыша при межвидовой гибридизации хлопчатника, что показано на примере скрещиваний *G.hirsutum* L. с дикими диплоидными видами *G.raimondii* Ulbr., *G.thurberi* Tod., *G.anomalum* Waw., *G.sturtii* F. Müell.

На основании цитозмбриологических исследований можно говорить о том, что экзогенные фитогормоны, после попадания их в зародышевый мешок, стимулируют процесс продвижения спермиев к яйцеклетке и центральному ядру. Подтверждением тому служит наличие в тканях завязи фитогормонов (меченых C^{14}), обнаруженных уже через 30 мин. после обработки. Это свидетельствует о непосредственном участии их в ходе основных эмбриональных процессов в семяпочках.

На основе проведенных исследований показано, что для каждой конкретной комбинации скрещивания характерны свои оптимальные концентрации и сочетания фитогормонов. Это свидетельствует о том, что несовместимость при отдаленной межвидовой гибридизации хлопчатника проявляется в нарушении регуляторной системы двух разнохромосомных генотипов в одной клетке.

Вместе с тем, экзогенные фитогормоны не только влияют на эмбриогенез, но и способствуют активации роста эпидермальных клеток, образующих волокно. Даже при отсутствии оплодотворения, при участии, в основном, растворов ИУК и ГК, увеличиваются размеры клеток нуцеллуса, внутреннего и наружного интегументов семяпочки.

На основе проведенных исследований показаны различные способы получения отдаленных межвидовых гибридов хлопчатника для конкретных вариантов гибридизации. Так, например, для комбинаций скрещивания *G.arboreum* x *G.hirsutum*, *G.herbaceum* x *G.hirsutum* положительные результаты получены при культивировании 2-3-суточных семяпочек с последующим изолированием и культивированием незрелых зародышей *in vitro* до формирования растений; для комбинаций *G.hirsutum* x *G.bickii*, *G.hirsutum* x *G.klotzschianum*, *G.hirsutum* x *G.davidsonii*; *G.hirsutum* x *G.triphyllum*, *G.hirsutum* x *G.harknessii* успешной были обработка семяпочек на 2-3-й день после опыления фитогормонами *in vivo*, вычленение и культивирование *in vitro* незрелых триплоидных зародышей; для комбинаций *G.hirsutum* x *G.raimondii*, *G.hirsutum* x *G.thurberi*, *G.hirsutum* x *G.sturtii*, *G.hirsutum* x *G.anomalum* обработка завязей фитогормонами *in vivo* была достаточна для получения полноценных триплоидных семян.

Изучение местных и американских сортов хлопчатника показало, что они далеки друг от друга не только географически, но и генетически. Это подтверждает зависимость индукции каллусогенеза и соматического эмбриондогенеза от генотипа сорта. В наших исследованиях удалось получить дифференцированные до различных стадий развития соматические эмбриониды на эмбрионном сорте *Coker-312*, которые при переходе к росту образуют растения, достигающие в течение месяца культивирования высоты до 4 см.

К важнейшим позитивным результатам наших исследований можно отнести получение клеточных линий, устойчивых к высо-

кому содержанию хлоридного засоления, при котором селективируются нормально растущие и делящиеся клетки. Последние показали возможность постановки исследований по клеточной селекции на солеустойчивость.

В процессе проведения исследований при помощи эмбриокультуры получены отдаленные межвидовые гибриды и их беккросс-потомство, а также была разработана схема их получения.

В настоящей работе приведены результаты изучения ряда новых линий хлопчатника, полученных на основе этой схемы. Они отличаются скороспелостью, высокой урожайностью и качеством волокна, соответствующим III-IV типу. Приведены также результаты изучения солеустойчивых линий, полученных традиционными и нетрадиционными методами селекции и созданного на их основе сорта Умид, успешно проходящего в настоящее время испытания на госсортоучастках республики.

Обобщая результаты проведенных научно-исследовательских работ по преодолению нескрещиваемости при разнохромосомной гибридизации, изучению методов культуры клеток и тканей, проведению клеточной селекции на солеустойчивость, а также получению амфидиплоидов и их беккросс-потомства можно сделать следующие выводы:

ВЫВОДЫ И РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Установлено, что дифференцированные зиготические зародыши предрасположены к самостоятельному росту, нежели соматические, для роста которых необходимо применение экзогенных фитогормонов. Поэтому, для нормального перехода к росту недозрелых гибридных зародышей (зиготических) хлопчатника присутствие фитогормонов в составе питательной среды не обязательно.

2. Оптимальная концентрация сахарозы в питательной среде при культивировании незрелых зародышей хлопчатника является 3 %. Миоинозит в концентрации 40 мг/г существенно влияет на морфогенез недозрелых зародышей хлопчатника, рост гипокотили и корня *in vitro*.

3. Разработан способ пересадки в грунт пробирочных растений, полученных с помощью культуры недозрелых зародышей хлопчатника *in vitro*.

4. Межвидовая несовместимость при различных комбинациях скрещивания разнотипных видов хлопчатника проявляется в различного рода отклонениях эмбриональных процессов, начиная с момента попадания чужеродной пыльцы на рыльце до образования гибридного семени.

5. Физиологические нарушения при межвидовой гибридизации хлопчатника связаны с фитогормональным дисбалансом, возникающим при скрещивании отдаленных видов и неблагоприятно влияющим на прохождение оплодотворения и эмбриогенеза. Проведение фитогормональной коррекции позволяет восстановить нормальный ход эмбриогенеза.

6. Роль экзогенных фитогормонов, в зависимости от степени несовместимости скрещиваемых видов в возрасте обрабатываемого материала, сводится к стимуляции роста пыльцевых трубок, к коррекции движения спермиев в зародышевом мешке, к регуляции первых делений зиготы и первичного ядра эндосперма, что положительно сказывается на завязываемости семян.

7. Установлено, что наиболее эффективные результаты в опытах по преодолению нескрещиваемости получены во всех изученных комбинациях скрещивания при обработке завязей растворами фитогормонов на второй день после опыления.

8. Для выведения дифференцированных гибридных зародышей

из состояния покоя необходимо проводить обработку *in vitro* растворами гибберелловой кислоты (70 мг/л) или кинетина (50 мг/л).

9. Показано, что из испытанных синтетических и естественных фитогормонов наиболее эффективными с точки зрения преодоления межвидовой несовместимости и образования гибридных семян оказались ИУК, гибберелловая кислота, кинетин и смесь ИУК с гибберелловой кислотой.

10. Для каждого конкретного варианта гибридизации отдаленных видов хлопчатника необходимо разрабатывать индивидуальные подходы (в том числе и биотехнологические) преодоления нескрещиваемости.

11. Разработанная схема получения амфидиплоидов хлопчатника и их беккросс-поколения позволит эффективно использовать дикie виды для переноса, присущих им, уникальных признаков в создаваемые новые формы.

12. Для полиплоидизации триплоидных гибридов, корешки проростков перед посадкой в грунт необходимо замачивать на 1-2 часа в 0,05-0,1 % растворах колхицина.

13. Беккросс-гибриды, полученные на основе межвидовой гибридизации хлопчатника и доведенные до линейного состояния, сочетают высокую урожайность со скороспелостью и хорошими показателями выхода и качества волокна. Данные линии подготовлены для передачи в станционное и конкурсное сортоиспытания.

14. Несмотря на сходство морфобиологических признаков изученных сортов вида *G. hirsutum* L. (С-4727 и С-6524) и американского сорта *Coker-312*, при их диаллельном скрещивании проявляется значительная генетическая отдаленность между ними.

15. Эффективная индукция каллусогенеза у хлопчатника отмечена из гипокотилей проростков на среде *Murashide-Scoog* с 1,0 мг/л ИУК и 0,1 мг/л кинетина. Дальнейшее субкультивирование следует проводить без использования фитогормонов.

16. Соматический эмбриогенез можно получить на каллусных клетках эмбриогенноспособного сорта *Coker-312* только в условиях суспензионной среды при двукратном субкультивировании с дальнейшим переводом клеток на агаризованную морфогенную среду без фитогормонов.

17. Соматические эмбриониды, полученные из каллусной массы сорта *Coker-312*, имеют различную форму и величину. У них от-

сутствуют упорядоченность формирования семядольных листьев, типичные центры полярной организации – эпифизис и гипофизис, нарушена нормальная организация главного корня.

18. Соматические эмбриониды на искусственной питательной среде к автономному развитию переходят на стадии формирования гребешкообразного семядольного листа и притупленного корешка (в стадии «клатос»), когда в их структуре наблюдаются хорошо развитые проводящие ткани.

19. В условиях засоления индукция каллусогенеза из гипокотили хлопчатника наблюдается при концентрации NaCl до 1,0 %. Дальнейшее повышение концентрации соли ингибирует каллусогенез.

20. В суспензионных условиях каллусные клетки хлопчатника способны выдерживать относительно высокие концентрации NaCl (до 2,0 %). При этом, в засоленных средах они приобретают овально-округлую форму, их размеры уменьшаются, количество резко сокращается. Под влиянием NaCl содержимое клетки становится прозрачным, цитоплазматические органониды скапливаются и располагаются в различных частях цитоплазмы. Несмотря на высокие концентрации NaCl в суспензионной селективной среде (1,4-2,0 %) сохраняются отдельные клетки с нормальной морфологической структурой и способностью к делению.

21. Показано, что при пересадке устойчивых клеточных линий на морфогенную агаровую среду, они способны восстанавливать морфологическую структуру, но не способны переходить к дальнейшему морфогенному развитию.

22. При разработке методов соматического эмбрионидогенеза для сортов вида *G.hirsutum* L. каллусные клетки необходимо индуцировать в среде MS с 2,4-Д (0,1 мг/л). Для получения соматических эмбрионидов необходимо неоднократное субкультивирование массы каллусных клеток в суспензионной среде без фитогормонов с последующим переносом их на агаризованную питательную среду MS с витаминами B-5 Гамборга.

23. Для получения клеточных линий *G.hirsutum* L., устойчивых к хлоридному засолению, клеточную селекцию в суспензионной среде можно начинать с 1,0; 1,5 и 2,0 % концентраций NaCl.

24. Установлено, что сорт Умид, при выращивании в условиях почвенного засоления, по основным хозяйственно-ценным показателям – урожайности, выходу и качеству волокна, превышает изученные стандартные сорта.

25. Отмечено, что средnezасолённые почвы влияют на изученные сорта и линии неодинаково, поэтому необходимо всестороннее их изучение на сильнозасолённых почвах.

26. Показано, что созданные традиционными и нетрадиционными методами селекции новые линии хлопчатника (МС-5, МС-8, Л-6, Л-13, Л-198) обладают комплексом основных хозяйственно-ценных признаков (урожайность, качество и количество волокна, масличность семян) и способны конкурировать с ныне высеваемыми в Республике сортами.

Исходя из литературных данных и результатов наших исследований, следует отметить, что для сельского хозяйства Узбекистана с его резко континентальным климатом биотехнологические методы должны быть важной составляющей при выведении новых сортов. При создании благоприятной инфраструктуры биотехнология станет мощной помощницей для традиционной селекции в выведении новых устойчивых и высокопродуктивных сортов растений.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Закон Республики Узбекистан: О семеноводстве // Ташкент, 1996.
2. Закон Республики Узбекистан: О селекционных достижениях // Ташкент, 1996.
3. Постановление Кабинета Министров Республики Узбекистан: О программе сортообновления и сорторазмещения хлопчатника на 1999-2000 г.г. // № 491, 25.11.1998.
4. Постановление Кабинета Министров Республики Узбекистан: О производстве хлопка-сырца, сортово размещении хлопчатника и мерах по совершенствованию сортообновления в 2002 году // № 477, 19.12.2001.
5. Постановление Кабинета Министров Республики Узбекистан: О мерах по совершенствованию организации семеноводства хлопчатника // № 604, 23.12.2004.
6. Абдель-Гани Хамдан. Некоторые особенности каллусогенеза и морфогенеза в культуре тканей представителей семейства мальвовых хлопчатника и окры (*Gossypium hirsutum* L. *Abelmoschus esculentus* L.). Автореф...на соиск. учен. степ. канд. биол. наук. Ташкент, 1999.
7. Абдукаримов А.А., Кузнецова Н.Н., Григина И.Н., Джатаев С.А., Садыков А.С. Регенерация растений из каллусной ткани *Gossypium klotzschianum* Anderss // АН СССР. 1987. № 2. С.502-505.
8. Абдукаримов А.А., Абидова М.А., Джатаев С.А., Калонтаров А.И., Кузнецова Н.Н., Мухамедов Р.С., Марцинковская А.И., Махмудова А.А., Мухамедханова Ф.С., Нуриджанянц С.С., Ташипулатов А.А., Усаченко С.И., Холмуратов Э.С., Ханазарова Д.К. Состояние и перспективы генно- и клеточно-инженерной биотехнологии хлопчатника // Проблемы и перспективы развития химии природных и физиологически активных веществ. Ташкент: Фан, 1988. С. 393-411.
9. Абдукаримов А.А. Развитие молекулярно-генетических исследований // Узбекский биологический журнал. 1993. № 4. С. 70-75.
10. Абдуллаев А.А., Омельченко М.В., Лазарева О.Н. Потенциал рода *Gossypium* – база создания перспективных сортов хлопчатника // Хлопководство. 1980. № 8. С. 29-38.
11. Абдуллаев А.А., Ризаева С.М., Эрнazarова З.А., Клят В.П., Курязов З.Б., Арсланов Д.М. Генофонд хлопчатника для создания перспективных сортов // Межд. науч.-прак. конф. «Современное состояние селекции и семеноводства хлопчатника, проблемы и пути их решения». Ташкент, 2007. С. 23-25.
12. Абуталибов М.Г. Выяснение физиологии устойчивости хлопчатника к высокой концентрации хлоридов // Труды Бот. ин-та Азербайджана. Т.IX. Баку, 1940.
13. Автономов В.А. Информационный листок «Новый сорт хлопчатника С-6524» // Ташкент: Мехнат, 1987. С. 4.
14. Автономов В.А., Кимсанбаев О.Х. Основные показатели общей и специфической комбинационной способности массы 1000 семян у гибридов тонковолокнистого хлопчатника // Пахтачилик ва дончилик. Ташкент, 2000. № 3-4. С. 18-20.
15. Азизходжаев А. Генотипическая реакция по морфогенезу *in vitro* у хлопчатника // Всесоюз. конф. по генетике соматических клеток в культуре. М., 1986. С. 51.
16. Азизходжаев А. Использование методов биотехнологии для получения гибридных зародышей хлопчатника // V съезд УзОГИС. Ташкент, 1986. С. 61.
17. Азизходжаев А. Новые методы в селекции // Сельское хозяйство Узбекистана. 1987. № 12. С. 3-4.
18. Азизходжаев А. Генотипическая реакция по эмбриогенезу *in vitro* у хлопчатника // Всесоюз. конф. по генетике соматических клеток в культуре. М., 1989. С.57.
19. Азизходжаев А. Ғўза эмбриокультурасида муртақлар мустақиллиги // Ғўза генетиқаси, селеқияси, уруғчилиги ва бедачилик масалалари тўплами. Тошкент, 1995. 80-84-б.
20. Азизходжаев А., Даминова Д.М. Влияние экзогенных фитогормонов на рост разновозрастных зародышей хлопчатника *in vitro* // Узбекский биологический журнал. 1988. № 5. С. 19-22.
21. Азизходжаев А., Даминова Д.М. Пути получения гибридных растений и семян при отдаленной межвидовой гибридизации хлопчатника // Межд. конф. «Биология культивируемых клеток и биотехнология». Новосибирск, 1988. Т.2, С.204.
22. 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.
23. Азизходжаев А., Даминова Д.М., Джурсаев Б.С. Влияние экзогенных фитогормонов на преодоление нескрещиваемости при отдаленной межвидовой гибридизации хлопчатника // I съезд физиологов растений Узбекистана. Ташкент, 1991. С. 154.
24. Азизходжаев А., Даминова Д.М., Джурсаев Б.С. Пути регуляции эмбриогенеза при разнохромосомной гибридизации хлопчатника // Генетика, селекция, семеноводство хлопчатника и люцерны. Сб. ВНИИССХ, Ташкент, 1992. С. 50-59.

25. Азизходжаев А., Даминова Д.М., Рахманкулов М.С. К проблеме соматического эмбриогенеза и клеточной селекции хлопчатника // Межд. науч.-практ. конф. «Теоретические и практические основы и перспективы развития селекции и семеноводства хлопчатника», Ташкент, 2002. С. 25-26.

26. Азизходжаев А., Даминова Д.М., Умаров З.М., Джурраев Б.С., Маматкаримова М.Э. Постгамная несовместимость при отдаленной межвидовой гибридизации хлопчатника и пути ее преодоления // Генетика, селекция и семеноводство хлопчатника. Ташкент, 1990. С. 77-82.

27. Азизходжаев А., Кандимов Т.Ш. Донорская способность вида *G. sturtii* к стресс-факторам внешней среды // Совещ. «Генетика развития растений и животных». Ташкент, 1990. Т. II, С. 9-10.

28. Азизходжаев А., Умаров З.М. Влияние миоинозита на морфогенез незрелых зародышей хлопчатника *in vitro* // Узбекский биологический журнал. 1985. № 5. С. 49-50.

29. Азизходжаев А., Умаров З.М. Регуляция морфогенеза *in vitro* при отдаленной межвидовой гибридизации хлопчатника // V съезд УЗОГИС. Ташкент, 1986. С. 62.

30. Азизходжаев А., Умаров З.М. Нетрадиционные методы в селекции хлопчатника // V съезд ВОГИС. М., 1987. Т. IV. С. 13.

31. Азизходжаев А., Умаров З.М. Влияние фитогормонов и витаминов на рост незрелых гибридных зародышей хлопчатника *in vitro* // Узбекский биологический журнал, 1988. № 2. С. 17-19.

32. Азизходжаев А., Умаров З.М., Даминова Д.М. Проблемы биотехнологии в селекции хлопчатника // Хлопководство. 1987. № 6. С. 43-44.

33. Азизходжаев А., Умаров З.М., Даминова Д.М. Гормональная регуляция *in vitro* при отдаленной разнохромосомной гибридизации хлопчатника // Узбекский биологический журнал, 1991. № 1. С. 69-72.

34. Азизходжаев А., Умаров З.М., Даминова Д.М., Джурраев Б.С. Эмбриокультура при беккроссировании амфидиплоидов хлопчатника // VI съезд УЗОГИС. Ташкент, 1992. С. 121.

35. Азизходжаев А., Умаров З.М., Даминова Д.М., Маматкаримова М.Э., Кандимов Т.Ш., Джурраев Б.С., Рахманкулов С. Рост и развитие *in vitro* незрелых гибридных зародышей хлопчатника // Генетика, селекция и семеноводство хлопчатника и люцерны. Тр. ВНИИССХ. Ташкент, 1989. С. 136-140.

36. Азизходжаев А., Эгамбердиев А.Э., Даминова Д.М., Умаров З.М., Лемешев Н.К. Беккросс-потомство амфидиплоидов. Получить его помогли экзогенные фитогормоны // Хлопок. 1989. № 2, С.39-40.

37. Азизходжаев А., Эгамбердиев А.Э., Даминова Д.М. Эмбриокультура хлопчатника // Технические культуры: селекция, технология, переработка. Сб. ВАСХНИЛ. М.: Агропромиздат, 1991. С. 92-99.

38. Азизхўжаев А., Даминова Д.М. *G.hirsutum* навларини *G.davidsonii* билан чатиштирганда номуносиблик ҳолати // Ғўза генетикаси, селекцияси, уруғчилик ва бедачилик масалалари тўплами. Тошкент, 1993, С. 34-38.

39. Азимов Р.А. Результаты поиска новых методов повышения солеустойчивости хлопчатника // Физиология и биохимия хлопчатника. Ташкент: Фан, 1973. С. 180-197.

40. Азимова Е.Д. Культивирование *in vitro* зародышей ячменя, изолированных на разных стадиях развития // Алма-Ата, 1989. С. 17.

41. Анапиев Б.Б., Блохина О.М., Евдакова Н.Л., Капиев Н.Л., Заиров С.З. Использование гаплоидных клеток *Triticum aestivum* L. для получения трансгенных растений // Биотехнология, теория и практика. 1997. № 3. С. 31.

42. Арутюнова Л.Г. Межвидовая гибридизация в роде *Gossypium* L. // Сб. «Вопросы генетики, селекции и семеноводства хлопчатника». Ташкент, 1960, С. 3-70.

43. Арутюнова Л.Г. О цитологических основах соматического расщепления у межвидовых гибридов хлопчатника (*Gossypium* L.) // Генетика. 1979. Т. XV, № 8, С. 1456-1468.

44. Арутюнова Л.Г., Губанов Г.Я. О причинах гибели растений в межвидовом скрещивании хлопчатника // Д. АН РУз, 1948. № 8. С. 17-21.

45. Ахмедов М.Б., Ахмедов Х.М. Поиск новых подходов для создания синтетических видов хлопчатника, основанных на кариологических данных // Межд. науч.-практ. конф. «Состояние селекции и семеноводства хлопчатника и перспективы её развития». Ташкент, 2006. С. 57-58.

46. Ахмедов М.Б., Ахмедов Х.М., Муталова М.К. О некоторых особенностях комплектации кариотипа хлопчатника и их использовании в селекции // «Ғўза, беда селекцияси ва уруғчилик» илмий ишлар тўплами. Тошкент: Фан, 2009. 93-100-б.

47. Ахметова А.Ш., Байбурина Р.К., Миронова Л.Н. Культура изолированных зародышей гибридных форм тюльпана // Тезисы докладов и сообщений, представленных на Всероссийский симпозиум «Биология клетки в культуре». Спб., 17-19 октября 2006 г.

48. Бабамуратов Х. Наследование некоторых морфологических и хозяйственно-ценных признаков в потомстве трёхвидового гибрида хлопчатника // Автореф. дис... канд. с/х. наук. Ташкент, 1982. – 24 с.

49. Банникова В.П. Цитозмбриология межвидовой несовместимости у растений. Киев: Наукова думка, 1975. С. 283.

50. Банникова В.П. Межвидовая несовместимость растений. Киев: Наукова думка, 1986. С. 230.

51. Банникова В.П., Хведынич О.А. Основы эмбриологии растений. Киев: Наукова думка, 1982. С. 164.

52. Барам Н. Госсипол: ҳам захар, ҳам шифо // Наука и жизнь Узбекистана. 2007. № 1-2, С. 41-42

53. Батыгина Т.Б. Процесс оплодотворения при отдаленной гибридизации в роде *Triticum* // Ботанический журнал АН СССР. 1966. Т. 51, № 10, С. 1461-1479.

54. Батыгина Т.Б. Семя. Эмбриология цветковых растений // Терминология и концепции. СПб., 1997. Т. 2. С. 635-648.

55. Белоус В.Е., Ильченко И.И. Выращивание *in vitro* незрелых эмбрионов // Тез. докл. 7 съезда Всес. бот. общ-ва. Донецк, 1983. С. 257.

56. Беляева Н.С. Изучение эмбриональных процессов при скрещивании разнохромосомных видов хлопчатника (*G.barbadense* x *G.herbaceum*) // Изв. Туркм. АН. Сер.биол., 1968. № 1, С. 3-9.

57. Бурдасов В.М. Пути использования метода изолированных зародышей в селекции яблони // Тканевые и клеточные культуры в селекции растений. М.: Колос, 1979. С. 52-57.

58. Бурыгин В.А. Солеустойчивость хлопчатника в свете проблемы галлофитизма: Автореф. дис... докт. с/х. наук. Ташкент, 1952. - 27 с.

59. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. - 272 с.

60. Бутенко Р.Г. Клеточные технологии для получения экономически важных веществ растительного происхождения // Культура клеток растений и биотехнология. М.: Наука, 1986. С. 3-20.

61. Бутенко Р.Г., Азизходжаев А. Действие фитогормонов на рост волокна *in vitro* у генетически различных форм хлопчатника // Всесоюз. IV конф. «Культура клеток растений и биотехнология». Кишинёв, 1983. С. 46.

62. Бутенко Р.Г., Азизходжаев А. Влияние фитогормонов на образование волокна семяпочками хлопчатника // Культура клеток растений и биотехнология. М.: Наука, 1986. С. 26-28.

63. Бутенко Р.Г., Кучко А.А. Получение межвидового соматического гибрида картофеля методом слияния изолированных протопластов // Докл. АН СССР. 1979. Т. 247. № 2. С. 491-495.

64. Быкова Е.В., Лев С.В., Мусаев Д.А. Цитогенетическое исследование каллусных тканей некоторых видов хлопчатника в длительно

пассируемой культуре // Цитология и генетика, 1988. 22. № 3. С. 49-51.

65. Ванюшин Б.Ф. Молекулярные механизмы действия фитогормонов. // С/х. биология. 1985. № 5. С. 110-112.

66. Весманова О.Я., Зуева С.Н., Эргашев А.-К.Э. Влияние некоторых условий культивирования на рост культуры тканей хлопчатника *G.arboreum* L. // Узбекский биологический журнал, 1989. № 6. С. 46-49.

67. Весманова О.Я., Шляхов Ю.В., Эргашев А.-К.Э. Оценка способности хлопчатника к микроклональному размножению из меристематической ткани // Узбекский биологический журнал, 1989. № 4. С. 47-52.

68. Вечернина Н.А., Таварткиладзе О.К., Жаркова С.В. Каллусогенез и регенерационная способность тканей и органов *Allium cepa* L. *in vitro* // Известия Государственного Алтайского университета. 2000. № 3 (17).

69. Власова М. О некоторых особенностях процесса опыления и оплодотворения при межвидовой гибридизации хлопчатника // Д. АН РУз. 1962. № 12. С.47-49.

70. Власова Н.А., Нурутдинова Ф.Р. Рост волосков хлопчатника при действии некоторых регуляторов роста в условиях культуры семяпочки // Узбекский биологический журнал, 1985. № 2, С. 51-54.

71. Власова Н.А., Руми В.А., Раджабова Д.Х. Цитозмбриологические причины нескрещиваемости различных форм хлопчатника // Генетика и цитозмбриология хлопчатника. Ташкент: Фан, 1979. С. 52-57.

72. Выхристов Г.И., Копылов С.С. Культивирование меристем тюльпанов и нарциссов для получения безвирусного посадочного материала // Науч. труды НИИ горн. садовод. и цветовод. 1987. № 34. С. 71-82.

73. Гапоненко А.К. Генетические процессы в культуре соматических клеток хлебных злаков – ячменя (*Hordeum vulgare* L.), твердой (*Triticum durum* Desf.) и мягкой (*Triticum aestivum* L.) пшеницы // Автореф. докт. дис... СПб. 1992, С. 54.

74. Генкель П.А. Солеустойчивость растений и пути ее направленного повышения // 12-е Тимирязевские чтения. М.: 1954.

75. Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Слияние протопластов и генетическое конструирование высших растений. Киев: Наукова Думка, 1982. С. 104.

76. Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Клеточная инженерия растений. Киев: Наукова думка, 1984. - 160 с.

77. Даминова Д.М. Влияние гибберелловой кислоты на рост незрелых гибридных зародышей хлопчатника // Межд. конф. «Биология культивируемых клеток и биотехнология». Новосибирск, 1988. Т.2. С. 204.

78. Даминова Д.М. Физиологическая концепция нескрещиваемости при отдаленной межвидовой гибридизации хлопчатника // Конф. молодых ученых по актуальным вопросам хлопководства. Ташкент, 1989. С. 12-13.

79. Даминова Д.М. Преодоление нескрещиваемости у хлопчатника действием экзогенных фитогормонов. Автореф. дис... канд. биол. наук, Ташкент, 1993. - 22 с.

80. Даминова Д.М. Нетрадиционные методы селекции хлопчатника // Мат. Форума «Роль женщин-ученых в развитии науки и техники Республики Узбекистан». Ташкент, 2004. С. 263-266.

81. Даминова Д.М., Джурраев Б.С. Явление несовместимости при гибридизации *G.hirsutum* L. x *G.raimondii* Ulbr. // Конф. «Биология ва экологиянинг хозирги замон муаммолари». I кистм. Тошкент, 1995. 28-б.

82. Даминова Д., Рахманкулов М.С. Клеточная селекция хлопчатника // Межд. науч.-прак. конф. «Состояние селекции и семеноводства хлопчатника и перспективы ее развития». Ташкент, 2006. С. 76-77.

83. Даминова Д.М., Рахманкулов М.С. Методы получения межвидовых гибридов хлопчатника // Межд. конф. «Современное состояние селекции и семеноводства хлопчатника, проблемы и пути их решения». Ташкент, 2007. С. 29-31.

84. Даминова Д.М., Рахманкулов С. Изучение признака скороспелости у беккросс-поколений амфидиплоидов хлопчатника // Межд. науч. конф. «Эволюционные и селекционные аспекты скороспелости и адаптивности хлопчатника и других с/х культур». Ташкент, 2005. С. 103-104

85. Добош Н.П. Клональное размножение сахарной свеклы // Селекционно-генетические методы повышения урожайности, качества и устойчивости полевых культур. Кишинёв, 1988. С.52-56.

86. Долгова-Хведынич О.А. Оплодотворение при отдаленной гибридизации вида *Crepis* // Ботанический журнал, 1967. Т. 52. № 6, С. 759-771.

87. Жалилов О.Ж., Яминов Т.Э., Абдураимов О. Каримов Е.Э. Янги истикболли навлар сновдан ўтмоқда // Пахтачилик ва дончилик. Тошкент, 2000. № 3/4. 5-6 б.

88. Жексембекова М.А., Сафаров К.С. Особенности формирования соматических эмбриондов в культуре тканей амаранта // Биотехнология, теория и практика. 1997. № 3. С. 49-50.

89. Загорская Н.А., Шамина З.Б. Способность к регенерации в культурах тканей разного происхождения // Культура изолированных органов, тканей и клеток растений. М.: Наука, 1970. С. 158-162.

90. Зайцев Г.С. К вопросу о плодотворении при межвидовом скрещивании хлопчатника. // Тр. Туркестанской селекционной станции. Л., 1924. Вып.2. С. 91-116.

91. Зайцев Г.С. Избранные труды. Ташкент: Фан, 1980. - 296 с.

92. Здруйковская-Рихтер А.И. Культура изолированных зародышей и генеративных органов как метод селекции плодовых растений // Тканевые и клеточные культуры в селекции растений. М.: Колос, 1979. С. 57-70.

93. Здруйковская-Рихтер А.И. Рост и дифференцировка изолированных зародышей бобовых растений *in vitro* // Биологический журнал, 1985. Т. 70. С. 1355-1362.

94. Иванова Й.А. Фитогормоны и регуляция метаболизма в онтогенезе растений // Гормональная регуляция онтогенеза растений. М.: Наука, 1984. С. 127-140.

95. Идиятуллина Д.Л. Цитозмбриологические причины нескрещиваемости диких видов хлопчатника и стерильность полученных гибридов. Автореф. дис... канд. биол. Наук. Ташкент, 1983. - 22 с.

96. Калиев А.Б., Акуленко Н., Евдакова Н.Л., Галиева Л.Д., Блохина О.М., Заиров С.З. Влияние 5-нетранслируемой последовательности на экспрессию чужеродных генов в трансгенных растениях // Биотехнология, теория и практика. 1997. № 3. С. 35.

97. Калиев А.Б., Евдакова Н.Л., Галиева Л.Д., Блохина О.М., Заиров С.З. Получение трансгенных растений с экспрессируемым IPT-геном // Биотехнология, теория и практика. 1997. № 3. с. 35-36.

98. Калинин Ф.Л. Культура изолированных зародышей как возможный путь переделки природы растений // Тр. Ин-та физиол. растений РАН, 1951. Т.7, Вып. 2. С. 153-192.

99. Кашан С.С. Вопросы селекции хлопчатника. Избранные труды. Ташкент: Фан, 1981. - 232 с.

100. Катасонова А.А., Шяхметов Н.Ф. Типы органогенеза в культуре *in vitro* зародышевого каллуса яровой мягкой пшеницы // Тезисы докладов и сообщений, представленных на Всероссийский симпозиум «Биология клетки в культуре». Спб., 17-19 октября 2006 г.

101. Ковальчук Р.И. Преодоление нескрещиваемости у отдаленных видов хлопчатника и стерильности у полученных при этом гибридов с помощью стимуляторов роста // Узбекский биологический журнал, 1963. № 1. С. 20-26.

102. Ковда В.А., Захарина Т.В. Засоление орошаемых земель и их мелиорация в зарубежных странах. М., 1969.

103. Козут И.Д., Пика Н.А., Мицко В.Н. Способ получения гибридных семян картофеля: А.С.: МКИ А 01Н1(02), 1985. Бюл. № 12. - 1 с.

104. Коллизерко Е.И., Орешкина Н.Я., Гусько А.В. Взаимосвязь роста пероксидазной и ИУК-оксидазной активности в каллусных тканях фасоли при засолении среды // «Физиология растений». 1988. 35. № 1. С. 165-174.

105. Королева Н.С. Быстрорастущая эмбрионная каллусная культура *G.hirsutum* L. // Респ. конф. «Генетика и микробиология – сельскому хозяйству», Душанбе, 1989. С. 38-39.

106. Королева Н.С., Юлдашев О.Х. Каллусогенез 10 линий *Gossypium hirsutum* L. // Респ. конф. «Генетика и микробиология – сельскому хозяйству», Душанбе, 1989. С. 35-36.

107. Кременская Е.М. Влияние обработок растений – доноров пыльников фитогормонами на стадии проростка на показатели андрогенеза *in vitro* // Современные проблемы генетики, биотехнологии и селекции растений. Харьков, 2003. С. 55-56.

108. Круглова Н.Н. Универсальность путей морфогенеза *in vitro* клеток каллусов различного происхождения // Тезисы докладов и сообщений, представленных на Всероссийский симпозиум «Биология клетки в культуре». Спб., 17-19 октября 2006 г.

109. Кузиев Р. Современное состояние орошаемых почв Узбекистана // Бюллетень ВАК РУз. Ташкент, 2005. № 1, С. 38-42.

110. Кулаева О.Н., Хохлова В.А., Фофанова Т.А. Цитокинин и абсцизовая кислота в регуляции роста и процессов внутриклеточной дифференцировки // Гормональная регуляция онтогенеза растений. М.: Наука, 1984. С. 71-86.

111. Кулиев Т., Ёразбоев И. Ёза дурагайларилинг махсулдорлигига тупроқ шўрланганлик даражасининг таъсири // Қишлоқ хўжалиги тараққийотининг илмий асослари. Халқ. илм.-амал. конф. маър. тезислари. Т., 2001. 13-14 б.

112. Куликов А.М. ГМО и риски их использования, 2005, http://www.oagb.ru/lib.php?txt_id=975.

113. Кучеренко Л.А. Индуцированный морфогенез в культуре тканей риса и его использование для создания исходного селекционного материала // Культура клеток растений и биотехнология. М.: Наука, 1986. С. 211-213.

114. Кучкоров О., Мунасов Х., Кушалиев А., Шодмонов Ж. Кучли шўрланган тупроқларда яратилган янги гуза тизмаларининг тола си-

фати // «Қишлоқ хўжалиги тараққийотининг илмий асослари». Халқ. илм.-амал. конф. маър. тезислари. Тошкент, 2001. 16-18 б.

115. Лев С.В., Быкова Е.В., Мусаев Д.А. Генотипические различия в реакции каллусных тканей диплоидных и тетраплоидных видов хлопчатника на регуляторы роста // ДАН РУз. 1987. № 5. С. 51-53.

116. Лев С.В., Умаров А.А., Ходжаева Г.А. Действие природных и синтетических регуляторов на рост и морфогенез в культуре тканей хлопчатника // 2 Всес. конф. «Регуляторы роста и развития растений». Киев, 1989. С. 249.

117. Лев С.В., Ходжаева Г.А., Дейсидзе Л.А., Быкова Е.В., Косых Т.В., Мусаев Д.А. Морфогенез и регенерация растений в культуре каллусных тканей хлопчатника // ДАН СССР. 1986. 288. № 3. С. 766-768.

118. Лев С.В., Ходжаева Г.А., Мусаев Д.А. Эмбрионная каллусная ткань хлопчатника *G.hirsutum* L., полученная из отрезков гипокотили // ДАН СССР, 1985. 283. № 1. С. 240-242.

119. Лемешев Н.К., Шахмедова Г.С. Преодоление стерильности при гибридизации разнохромосомных хлопчатников для создания нового генофонда // Генетико-селекционные аспекты систем размножения энтомофильных видов растений. Душанбе, 1987. С. 148-157.

120. Ленивко С.М., Орлов П.А. Отзывчивость в культуре *in vitro* диплоидных линий мягкой пшеницы и их гибридов F₁ // Современные проблемы генетики, биотехнологии и селекции растений. Харьков, 2003. С.58-59.

121. Линскенс Г.Ф. Реакция торможения при несовместимом опылении и её преодоление // Физиол. растений. 1973. Т. 20. Вып. 1. С. 192-203.

122. Лужьянюк С.Ф. Разработка приемов *in vitro* для получения гаплоидов в ячменя и тритикале: Автореф. дис... канд. биол. наук, М., 1983. - 24 с.

123. Матвеева Н.А., Сидоров В.А. Изучение особенностей микроклонального размножения пшеницы // Физиол. и биох. культ. растений. 1989. Т. 21. № 4. С. 400-402.

124. Мауер Ф.М. Происхождение и систематика хлопчатника, 1954. Т.1. - 383 с.

125. Мезенцева А.В., Голышкина Н.А., Солодкая Л.А. Создание исходного материала клевера и люцерны методом культуры клеток и тканей // Сб. науч. тр. ВНИИ кормов. 1984. № 3. С. 57-62.

126. Мезенцев А.В., Карелина И.С. Влияние генотипических особенностей люцерны на каллусообразование и соматический эмбриогенез при различных условиях культивирования тканей // Генетика. 1982. Т.18. С. 999-1003.

127. *Михантьева О.Н., Михантьев В.Б., Лебедева Э.Н.* Влияние ростовых веществ на корнеобразование стеблевых черенков // II Всесоюз. конф. по регуляторам роста и развития растений. Тез. докл. Киев, 1989. С. 258.

128. *Мулинджонов Х.А., Анварова М.А., Насыров Ю.С.* Особенности регенерации различных генотипов картофеля *in vitro* // Биотехнология, теория и практика. 1997. № 3. С. 58.

129. *Мунасов Х., Қўчқоров О., Муратов Ў., Тожибоев Т.* Шўрланган ва сув танқислиги фонларда ўстирилган тизмаларнинг айрим кимматли-хўжалик кўрсаткичлари // Ёўза генетикаси, селекцияси, уруғчилик ва бедачилик масалалари тўплами. Тошкент, 2002. 104-110 б.

130. *Мунасов Х., Муратов Ў., Қўчқоров О., Алиқўжаева С.С.* Шўрланган тупрокда ўстирилган айрим тизмаларнинг эртапишарлиги ва хосилдорлиги // Ёўза генетикаси, селекцияси, уруғчилик ва бедачилик масалалари тўплами. Тошкент, 2002. 97-103 б.

131. *Назаров Р.С., Автономов В.А.* Тенденции развития // O'zbekiston qishloq xo'jaligi. 2008. № 10. С. 25.

132. *Назирова Н.* Наука и хлопок // Ташкент: Узбекистан, 1977. - 276 с.

133. *Намазов Ш.Э.* Ёўзанинг турлараро дурагайларида айрим белгилар корреляцияси // «Навлари янгилаш, жойлаштириш ва парваришlash технологияси». Республика илмий амалий конференцияси маколалар тўплами. Тошкент, 2001. 96-99 б.

134. *Намазов Ш.Э.* Скороспелость и вилтоустойчивость в потомстве внутри- и межгеномных гибридов хлопчатника // Межд. науч. конф. «Эволюционные и селекционные аспекты скороспелости и адаптивности хлопчатника и других сельскохозяйственных культур». Ташкент: Фан, 2005. С. 65-66.

135. *Намазов Ш.Э.* Межвидовая гибридизация – эффективный способ улучшения продуктивности хлопчатника // Мат. междун. науч.-практ. конф. «Состояние селекции и семеноводства хлопчатника и перспективы ее развития». Ташкент, 2006. С. 110-111.

136. *Никифорова И.Д., Чернов В.А., Швидченко В.К., Бутенко Р.Г.* Рост и морфогенез клеток яровых пшениц в стрессовых условиях и отбор устойчивых вариантов // Межд. конф. «Биология культивируемых клеток и биотехнология». Новосибирск, 1988. С. 178-179.

137. *Никова В.* Использование методов *in vitro* для получения форм табака с цитоплазмой *N.paniculata*, обладающих мужской стерильностью // Межд. конф. «Биология культивируемых клеток и биотехнология». Новосибирск, 1988. С. 399.

138. *Николаева М.Г.* Влияние β-индолилуксусной кислоты на проростание семян и рост зародышей и её взаимодействие с другими гормонами // Физиология растений. 1974. Т. 21. Вып. 5. С. 919-226.

139. *Новиков В.А.* Исследование солеустойчивости хлопчатника // Труды Узбекского филиала АН СССР. Ташкент, 1942. Сер. XI. Вып. 5.

140. *Новиков В.А.* Мелиорация засоленных орошаемых земель Узбекистана // Ташкент: Узбекистан, 1943. – 7 с.

141. *Орлова И.В., Семенов Е.Г., Володин В.В., Носов А.М., Бурьянов Я.И.* Разработка системы регенерации и генетической трансформации *Rhaponticum carthamoides* – продуцента экистероидов // Физиология растений. М., 2000. Т. 47. С. 402-407.

142. *Паушева З.П.* Практикум по цитологии растений. Изд. 3. М., 1980.

143. *Пилипенко А.А., Юлдашева М.К., Мухамедханова Ф.С., Джатаев С.А.* Метод получения эмбрионной ткани риса (*Oryza sativa L.*) // Современные проблемы генетики, биотехнологии и селекции растений. Харьков, 2003. С. 77-78.

144. *Пирюзян Э.С.* Основы генетической инженерии растений. М.: Наука, 1988. - 303 с.

145. *Плотникова Г.А., Высоцкий В.А.* Получение сеянцев вишни и черешни из эмбрионов, изолированных на ранних стадиях развития // «Биологические аспекты повышения продуктивности животных и растений». Тез. докл. конф. молодых учёных-биологов. Рига, 1984. С.127-129.

146. *Поддубная-Арнольди В.А.* Общая эмбриология покрытосеменных растений. М.: Наука, 1964. - 481 с.

147. *Пролетова Н.В., Поляков А.В., Лошакова Н.И., Виноградова Е.Г.* К получению биотехнологическими методами устойчивых к фузариозному увяданию форм льна-долгунца // Второй всерос. съезд по защите раст. «Фитосанитарное оздоровление экосистем». СПб., 2005. Т.П. С. 214-215.

148. *Пулатов Н.* Значение отбора семян для повышения солеустойчивости хлопчатника. Ташкент: Фан, 1977. – 89 с.

149. *Раковцева Т.С., Перицина Л.А., Кравцова Л.А., Щапова А.И.* Эффект отдельных хромосом ржи на формирование каллуса с разным типом регенерации в культуре незрелых зародышей пшенично-ржаных замещенных линий // Современные проблемы генетики, биотехнологии и селекции растений. Харьков, 2003. С. 80-81.

150. *Рахимбаев И.Р.* Культура репродуктивных клеток и гаплоидная биотехнология генетического улучшения растений. - Биотехнология, теория и практика, 1997, №3, с.8-10.

151. Рахимбаев И.Р., Джумашева Д.К., Нурмуханбетова Г.А. Вегетативное микроразмножение луковичных растений. Алма-Ата: Наука, 1985. - 112 с.

152. Рахимбаев И.Р., Тивари Ш., Бишимбаева Н.К., Кушнаренко С.В., Азимова Е.Д. Биотехнология зерновых культур. Алматы, Гылым, 1993. - 240 с.

153. Рахманкулов М., Даминова Д., Рахманкулов С. Влияние селективных сред с хлоридным засолением на морфологию и биологию каллусных клеток *G.hirsutum* L. // Ёўза генетикаси, селекцияси, уруғчилиги ва бедачилик масалалари тўплами. Тошкент, 2002. 150-154 б.

154. Рахманкулов М.С. NaCl-лик селектив озўқада ёўза каллус хўжайраларнинг ўсиши ва ривожланиши // Пахтачилиги ва дончилиги илм.тех.ж. 1998. № 3, 24-26 б.

155. Рахманкулов М.С. Зависимость индукции каллусных клеток хлопчатника от концентрации фитогормонов в питательной среде // «Қишлоқ хўжалиги самарадорлигини ошириш – давр талаби». Тошкент, 1998. 97-100 б.

156. Рахманкулов М.С. Индуцирование каллусных клеток хлопчатника из гипокотилей стеблей // Узбекский биологический журнал. № 1. 1999. С. 69-70.

157. Рахманкулов М.С. Биология культивируемых клеток *Gossypium hirsutum* L. на селективных средах с NaCl.: Автореф. дис... канд. биол. наук, Ташкент, 2001. - 23 с.

158. Рахманкулов М.С., Азизходжаев А. Автономность соматических зародышей хлопчатника // Вестник Россельхозакадемии. 2001. № 2. С. 36-37.

159. Рахманкулов М.С., Даминова Д.М. NaCl-лик селектив озўқани ёўза хўжайраларини ўсиши ва морфологиясига таъсири // Ёўза генетикаси ва агротехникасининг муаммолари. Тошкент, 1995. 47-50 б.

160. Рахманкулов М.С., Рахманкулов С.Р. Изучение новых линий хлопчатника на солеустойчивость // Межд. науч.-прак. конф. «Вавиловские чтения». Саратов, 2008. Ч.1. С.38-39.

161. Рахманкулов С.Р., Азизходжаев А., Даминова Д.М., Рахманкулов М.С. Культивирование *in vitro* незрелых зародышей хлопчатника // Межд. науч.-прак. конф. «Вавиловские чтения». Саратов, 2008. Ч.1. С.36-38.

162. Рахманкулов С.Р., Рахманкулов М.С., Даминова Д.М. Янги ёўза тизмаларини шўрланган тупроқ шароитида ўрганиш. // “Фермер хўжаликларида пахтачилиги ва ғаллачиликни ривожлантиришнинг илмий асослари”. Халқаро илм.-амал. конф. маърузалари асосидаги мақолалар тўплами. Тошкент, 2006. 442-444 б.

163. Руми В.А. Обзор работ по цитозмбриологии хлопчатника в институте экспериментальной биологии растений Академии наук РУз // Ботанический журнал, 1967. № 1. С. 109-115.

164. Руми В.А. Процесс оплодотворения в развитии зародыша у новосветских диких видов хлопчатника // Узбекский биологический журнал., 1976. № 3. С. 62-64.

165. Селиванкина С.Ю., Романко Е.Г., Куроедов В.А., Оманн Э. Влияние цитокининов на синтез РНК в этиолированных проростках ржи // Физиология растений. 1976. Т. 23. Вып. 5. С. 1022-1034.

166. Серазетдинова Л.Д., Лесова Ж.Т., Полимбетова Н.С., Жардемалиев Ж.К., Карабаев М.К. Клеточная селекция пшеницы на устойчивость к стрессам и изучение биохимических изменений в культуре клеток *in vitro* // Биотехнология, теория и практика. 1997. № 3. С.38-39.

167. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. Киев: Наукова Думка, 1990. - 280 с.

168. Сорока А.И. Влияние состава среды на процессы каллусогенеза и регенерации в культуре пыльников льна // Цитология и генетика. 2004. Т. 38. № 2. С. 20-25.

169. Станис В. Изучение соматической изменчивости райграса пастбищного // Науч. конф. «Теоретические и практические вопросы генетики и селекции микроорганизмов, растений и животных». Вильнюс, 1985. С. 63-64.

170. Страумал Б.П. Сорт 108-Ф. Ташкент: Фан, 1977. - 110 с.

171. Строганов Б.П. Физиология солеустойчивости хлопчатника // Хлопчатник. Ташкент, 1960. Т. 4.

172. Строганов Б.П. Физиологические основы солеустойчивости растений. М., 1962.

173. Строганов Б.П., Клышев Л.К., Азимов Р.А. Проблемы солеустойчивости растений. Ташкент: Фан, 1989. - 184 с.

174. Сукупов М.П., Мўминова Б.Х. Сув танқислигининг ёўза дурагайларида хўжалик учун фойдали белгининг ирсийланишига таъсири // Ёўза генетикаси, селекцияси, уруғчилиги ва бедачилик масалалари тўплами. Тошкент, 1995. 51-56 б.

175. Суриков И.М. Морфологические, генетические и эволюционные аспекты теории внутривидовой и межвидовой половой несовместимости у цветковых растений // Генетико-селекционные аспекты систем размножения энтомофильных видов растений. Душанбе: Дошиш, 1987. С. 3-20.

176. Суриков И.М., Воробьева Г.А., Гавриленко Т.А. Преодоление нескрещиваемости культурного томата с дикими видами *Lycopersicon*

chilense и *Solanum Lycopersicoides* в эмбриокультуре // Состояние и перспективы развития с/х биотехнологии. Л., 1986. С. 52-61.

177. Тер-Аванесян Д.В. Хлопчатник. Л.: Наука, 1973. — 483 с.

178. Ткаченко О.В. Генетические аспекты культивирования клеток и тканей пшеницы *in vitro* // Современные проблемы генетики, биотехнологии и селекции растений. Харьков, 2003. С. 101-102.

179. Тулайков Н.М. Растение и соли почвы // Журнал опытной агрономии. Ташкент, 1922. Т. XIII. Кн. I.

180. Тураев А.М., Шамина З.Б. Оптимизация состава среды для культивирования пыльников хлопчатника // Физиология растений. 1986. 33. № 3. С. 565-571.

181. Турпанова Р.М. Технология получения регенерантов в культуре протопластов картофеля // Биотехнология, теория и практика, 1997, № 3, С. 40-41.

182. Турпанова Р.М., Лесова Ж.Т., Серазетдинова Л.Д., Лигай П.Г., Карабаев М.К. Получение устойчивых к засолению клеточных линий картофеля // Биотехнология, теория и практика. 1997. № 3. С. 39-40.

183. Удовенко Г.В. Солеустойчивость культурных растений. Л.: Колос, 1977. — 215 с.

184. Уралев Л.И. Культура *in vitro* репродуктивных органов томатов и перспективы её использования. Автореф. дис... канд. биол. наук. М., 1982. — 21 с.

185. Хабиев Р. Земли Узбекистана на грани истощения. Газета «Новое русское слово». 12.02.2008

186. Худяк М.И. Эндосперм покрытосеменных растений. Киев, 1963. — 183 с.

187. Чайлахян М.Х. Регуляция цветения высших растений. М.: Наука, 1988. — 560 с.

188. Чудаков С. Трансгенные растения — жизнь или смерть? // Источник: «Аграрное обозрение», сентябрь-октябрь 2008 (<http://www.warandpeace.ru/ru/article/view/30546/page=2/>).

189. Шамаров С., Шамсутдинов Ш., Ходжа-Ахмедов Э., Якубов М. Генетический анализ тонковолокнистых сортов хлопчатника по выходу волокна. «Қишлоқ хўжалиги самарадорлигини ошириш — давр талаби». ТошДАУ проф.-ўқит., аспирант ва иқтид. талабаларнинг илмий мақолалар тўплами. Тошкент, 1998. 123-125 б.

190. Шамина З.Б. Мутагенез и селекция на уровне соматических клеток растений. «Биотехнология». М., 1984. С. 260-266.

191. Шевелуха В.С. Биотехнологии и биобезопасность в агропромышленном производстве. Достижения науки и техники АПК. 2004. № 1. С. 6-10 (<http://www.cbio.ru/modules/news/article.php?storyid=70>).

192. Широкова Ю.И., Морозов А.Н. Причины засоления и современное состояние орошаемых земель Узбекистана. // Проблемы использования водных, земельных и гидроэнергетических ресурсов Центрально-Азиатского региона. 2008. Вып.16 (<http://water-salt.nm.ru/cs-cs-uz-s.htm>).

193. Шодмонов Ж., Қулиев Т., Шонълатов У. Мирзачўл шаронтида ўрта толали ғўза навларидан сифатли тола тайёрлаш имкониятлари // «Пахтачилик ва дончиликни ривожлантириш муаммолари». Халк. илм.-амал. конф. маър. Тошкент, 2004. 312-313 б.

194. Щеглов Н.И. Метод культуры зародышей в генетико-селекционном изучении косточковых растений // Тканевые и клеточные культуры в селекции растений. М.: Колос, 1979. С. 85-93.

195. Щуплецова О.Н., Широких И.Г. Регуляторы роста в получении семенного потомства регенерантов ячменя. // Вавиловские чтения, Саратов, 2008. С. 53-54.

196. Эгамбердиев А. Трансгрессивная изменчивость при межвидовой гибридизации // Хлопководство. 1985. № 6. С. 26-28.

197. Эгамбердиев А., Азизходжаев А., Лемешев Н. Амфидиплоиды в селекции хлопчатника // Хлопок. 1990. № 5. С. 43-44.

198. Эрнazarova З.А. Завязываемость коробочек и семян при скрещивании Д и С геномных видов хлопчатника // I респ. науч. конф. молодых учёных «Теоретические и прикладные аспекты генетики и селекции животных, растений и микроорганизмов». Ташкент, 1990. С. 15.

199. Юркова Г.Н., Левенко Б.А., Новожиллов О.В. Пloidность каллусной ткани твёрдой и мягкой пшеницы // «Цитология и генетика». 1985. Т. 19. № 4. С. 264-267.

200. Янчик В.И., Белецкий Ю.Д., Смирнов В.А., Смирнова В.В. Влияние оптимальных сред для культивирования подсолнечника // Физиол. и биох. Культурных растений. Ташкент, 1989. 21. № 4. С. 351-357.

201. Яковлев С.П., Кожин А.В., Луткова Е.Н., Дубовицкая Л.А. Разработка способов культивирования недоразвитых зародышей и завязей груши // Тканевые и клеточные культуры в селекции растений. М.: Колос, 1979. С. 93-99.

202. Коллектив авторов. Методы агрохимических, агрофизических и микробиологических исследований в поливных хлопковых районах. СоюзНИХИ, 1963.

203. Коллектив авторов. Методика полевых опытов с хлопчатником. СоюзНИХИ, 1981.

204. Ahloowalia B.S. Regeneration of ryegrass plant in tissue culture. Crop Sci., 1975, v. 15, pp. 449-452.

205. Ahloowalia B.S. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eruca sativa*. "Crop Sci.", 1987, 27, № 4, pp. 813-814.
206. Ahloowalia B.S., Sherington J. Transmission of somaclonal variation in wheat. - Euphytica, 1985, v. 34, №2, pp. 525-537.
207. Altman D.W. Exogenous hormone applications at pollination for *in vitro* and *in vivo* production of cotton interspecific hybrids // Plant Cell Reports, 1988. 7. pp. 257-261.
208. Armstrong C.L., Phillips R.L. Genetic and cytogenetic variation in plants regenerated from organogenic and friable, embryogenic tissue cultures of maize. - "Crop Sci.", 1988, v 28, pp. 363-369.
209. Bajaj Y.P.S., Gill M.S. *In vitro* induction of genetic variability in cotton (*Gossypium ssp.*). - The out. appl. Genet., 1985, 70, 4, pp. 363-368.
210. Bajaj Y.P.S., Gozal S.S. Biotechnology of wheat improvement // Crops J. 1986. Vol. 2. pp. 3-38.
211. Balzan R. Karyotype instability in tissue cultures derived from the mesocotyl of *Zea mays* seedlings. - Caryologia, 1978, v. 31, pp. 75-87.
212. Barbier Martine, Dulieu Hubert. Early occurrence of genetic variants in protoplast cultures., 1983, 29, № 2-3, pp. 201-206.
213. Bayliss M.W. Chromosomal variation in plant tissues in culture. - Int. Rev. Cytol., 1980, v. 11A, pp. 113-114.
214. Beasley J.O. Hybridization of American 26-chromosome and Asiatic 13-chromosome species of *Gossypium* // Journ. Agric. Res. 1940. Vol. 60 (30). pp. 175-182.
215. Beasley J.O. The production of polyploids in *Gossypium*. - Journ. Heredity, 1940, 31, N 1, pp. 39-48.
216. Beasley J.O. Methodic chromosome behavior in species, hybrids, haploids and induced polyploids in *Gossypium*. - Genetics, 1942, V, 27, pp. 25-54.
217. Beasley S.A. *In vitro* culture of fertilized cotton ovules. Bio Science, 1971, 21, pp. 906-907.
218. Beasley S.A., Ting I.P. The effects of plant growth substances on *in vitro* development from fertilized cotton ovules. Amer. J. Bot., 1973, 61, pp. 130-139.
219. Beasley S.A., Ting I.P. Effects of plant growth substances on *in vitro* fiber development from unfertilized cotton ovules. - Amer. J. Bot., 1974, 61, pp. 188-194.
220. Benzion G., Phillips R.L. Cytogenetic stability of maize tissue cultures: a cell line pedigree analysis. Genome, 1988, v. 30, pp. 318-325.
221. Binarova P., Novak F.J. Selection of *Medicago sativa* L. cells lines resistant to ethionine and lysine+threonine. "Nucl. Nech. and *in vitro* Cult. Plant Imper. Proc. Int. Symp., Vienna, 19-23 Aug. 1985". Vienna, 1986, pp. 315-320.

222. Brubaker C.L., Wendel J.F. Reevaluating the origin of domesticated cotton (*Gossypium hirsutum*) nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). Am.J.Bot. 1994. № 81. pp. 1309-1326.
223. Buiatti M., Marcheschi G., Tognoni F., Lipucci di Paola M., Colina Greci F., Martini G. Genetic variability induced by tissue culture in the tomato (*Lycopersicon esculentum*). "Z.Pflanzenzucht.", 1985, 94, № 2, pp. 162-165.
224. Carman J.G., Jefferson N.E., Campbell W.F. Induction of embryogenic *Triticum aestivum* L. 1. Quantification of genotype and culture medium effects // Plant Cell Tis. Organ Culture. 1987. Vol. 10. pp. 101-113.
225. Chaleff R.S., Ray T.B. Herbicide-resistant mutants from tobacco cell cultures. "Science", 1984, 223, № 4641, pp. 1148-1151.
226. Chandler J., Beard B. Embryo culture of *Helianthus* hybrids. - Crop Sc., 1983, 35, 5, pp. 1004-1007.
227. Chee R., Pool R.M. *In vitro* propagation of Vitis: the effects of organic substances on shoot multiplication // Vitis. 1985. 24. № 2. pp. 106-118.
228. Chen Zhixian, Li Shujun, Trolinder N.L., Goodin J.R. Некоторые характеристики соматического эмбриогенеза и регенерации растений в суспензионной культуре клеток хлопчатника // «Чжунго пунье кэсюэ, Sci. agr. sin.». 1987. 20. № 5. pp. 6-11.
229. Cook E.L., Cunningham A., Staden J. The tissue culture of an exploited Zulu medicinal plant, *Bowiea volubilis*. - S. afr. J.Bot., 1988, 54, p. 509-510.
230. Cooper D.C., Brink R.A. Somatoplastic sterility as a callus of seed failure after interspecific hybridization. - Genetics, 1940, 25, N 6, pp. 593-616.
231. Davidonis G.N., Hamilton R. Plant regeneration from callus tissue of *Gossypium hirsutum* L. Plant Sc. Letters, 1983, 32, 1/2, pp. 89-93.
232. Donn Gunter, Tischer Edmund, Smith John A., Goodman Howard M. Herbicide-resistant alfalfa cells: an example of gene amplification in plants. "J. Mol. and Appl. Genet.", 1984, 2, № 6, pp. 621-635.
233. Dore C. Multiplication vegetative et conservation *in vitro* chez le poireau (*Allium porrum* L.) // Agronomic. 1988. 8. № 6. pp. 505-511.
234. Dryanovska O.A., Ilieva I.H. *In vitro* anther and ovule culture in muskmelon (*Cucumis melo* L.) // Докл. Болг. АН. 1983. 36. № 8. С. 1107-1110.
235. Dufour M., Dublin P. Quelques doumees sur la multiplication vegetative *in vitro* des cacaoyers cultives (*Theobroma cacao*) // Cafe, cacao, the. 1985. 29-114. pp. 235-244.
236. Durand Jacques. Mutations de resistance en culture chez une

plane superieure, *Nicotiana glauca*: isolement de mutations nucleaires et recherche de mutations du genome mitochondrial. Doct. etat. Sci. nat. Univ. Paris-Sud Cent. Orsay, 1984, pp. 228.

237. Feldmann K.A., Scholl R.L. Characterization of chlorate resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* in tissue cultures. "Tissue Cult. Forest. and Agr. Proc. 3rd Tenn Symp. Plant Cell and Tissue Cult., Knoxville, Tenn., 9-13 Sept., 1984." New York; London, 1985, pp. 316-317.

238. Finer J., Smith R. Initiation of callus and somatic embryos from explants of mature cotton (*Gossypium klotzschianum* Anderss.). Plant Cell Rep., 1984, 3, 1, pp. 41-43.

239. Finer J., Smith R. Isolation and culture of protoplast from cotton (*Gossypium klotzschianum* Anderss.) callus culture. Plant Sc. Letters, 1982, 26, 2/3, pp. 147-151.

240. Fukui K. Sequential occurrence of mutations in a growing rice callus. Theor. Appl. Genet., 1983, v. 65, pp. 225-230.

241. Gamborg O.L., Miller R.A. Embryogenesis and production of albino plants from cell cultures of *Bromus inermis*. - Planta, 1970, v. 95, pp. 355-358.

242. Gawel N. J., Rao A.P., Robacker C.D. Somatic embryogenesis from leaf and petiole callus cultures of *Gossypium hirsutum* L. "Plant Cell Repts.", 1986, 5, № 6, pp. 457-459.

243. Gerassimova E.N. Fertilization in *Creps capillaris* // Cellule, 1933. 42. pp.103-114.

244. Gill M.S., Bajaj Y.P.S. Interspecific hybridization in the genus *Gossypium* through embryo culture // "Euphytica", 1984. 33,2. pp. 305-311.

245. Gill M.S., Bajaj Y.P.S. In vitro induction of genetic variability in cotton (*Gossypium* spp.) // Theoret. appl. Genet. 1985. 70. 4. pp. 363-368.

246. Gill M.S., Bajaj Y.P.S. In vitro production of interspecific hybrids in *Gossypium* and their utilization in backcrossing // Z.Pflanzenzucht. 1986. 96,2. pp. 174-176.

247. Gill M.S., Bajaj Y.P.S. Hybridization in *Brassica juncea* x *Brassica campestris* through ovary culture // "Euphytica", 1988. 37. № 1, pp. 83-88.

248. Gould J., Banister S., Fahima M., Hasegawa O., Smith R. Regeneration of *Gossypium hirsutum* and *G.barbadense* from the shoot apex // Plant Cell Report. 1991. 10. pp. 12-16.

249. Gould J., Magallanes-Cedeno M. Adaptation of cotton shoot apex culture to Agrobacterium-mediated transformation // Plant Molecular biology reporter. 1998. 16. pp. 1-10.

250. Gupta H.S., Pattanayak A. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of rice (*Oryza Sativa* L.) // Bio/Technology. 1993. Vol. 11. pp. 90-94.

251. Harland S.C. Taxonomic relationship in the genes *Gossypium*. // J. Wash. Acad. Sci., 1940, v. 30, N 10, pp.426.

252. Heberle-Bors E. In vitro haploid formation from pollen: a critical review // Theor. Appl. Genet. 1985. Vol. 71. pp. 361-374.

253. He Zhuo-pei, Xu Zhu-yun, Xu Shu-ping, Loo Shih-wei. Устойчивая к морщинистости гаплоидная мутантная клеточная линия табака. "Шиянь шэньчжэнь", Acta boil. exp. sin., 1984, 17, № 2, pp. 171-176.

254. Hole David J., Smith J.D., Cobb P.G. Regulation of embryo dormancy by manipulation of abscisic acid in kernels and associated cob tissue of *Zea mays* L. cultured in vitro // Plant Physiol. 1989. 91. № 1. pp. 101-105.

255. Hossain M.M., Inden H., Asahira T. Intergeneric and interspecific hybrids through in vitro ovule culture in the *Cruciferae* // Plant Sci., 1988. 58. № 1. pp. 121-128.

256. Hutchinson J.B., Silow R.A., Stephens S.G. The evolution of *Gossypium* and the differentiation of cultivated cottons.- London e.a., Oxford Univ. Press, 1947, 160 p.

257. Irish E.E., Nelson T. Development of maize plants from cultured shoot apices.- Planta, 1988, 175, N 1, pp. 9-12.

258. Jacky P.B., Beek B., Sutherland G.R. Fragile sites in chromosomes: Possible model for the study of spontaneous chromosome breakage.- Science, 1983, v.220, pp. 69-70.

259. Johnson S.S., Phillips R.L., Rines H.W. Possible role of heterochromatin in chromosome breakage induced by tissue culture in oats (*Avena sativa* L.).- Genome, 1987, v. 29, pp. 439-446.

260. Karp A., Bright S.W.J. On the causes and origins of somaclonal variations. - Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol., 1985, v. 2, pp. 199-234.

261. Khan A.A., Tao K.L. Phytohormones seed dormancy and germination // Phytohormones and related compounds. North-Holland Biomedical Press, 1987. vol. 2. pp. 371-412.

262. Kim Yong-Hwan, Chung Tae-Young, Choi Won-Yul. Increased regeneration from NaCl. Euphytica, 1988, 39, № 3, pp. 207-212.

263. Kromer Krystyna D. Regeneration of some monocotyledonous plants from subterranean organs in vitro.- Acta agrobot., 1985, 38, N 2, pp. 65-87.

264. Kyozuka J., Hayashi Y., Shimamoto K. High frequency plant regeneration from rice protoplasts by novel nurse culture methods. Mol. Gen. Genet. 1987. Vol. 206. № 3 pp. 408-413.

265. Lai Kwan-Long, Liu Li-Tei. Infection and plant regeneration of callus from immature embryos of rice plants (*Oryza sativa* L.).- Jap. J. Crop Sci. 1982, 51, N1, pp.70-74.

266. Lee M., Philips R.L. Genomic rearrangements in maize induced by tissue culture.- Genome, 1987 a, v. 29, pp.122-128.
267. Lee M., Phillips R.L. Genetic variants in progeny of regenerated maize plants. - Genome, 1987 b, v. 29, p.834-838.
268. Lee M., Philips R.L. The chromosomal basis of somaclonal variation. - Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 1988, v. 39, pp. 413-437.
269. Lorz H., Scowcroft W. R. Variability among plants and their progeny regenerated from protoplasts of Su/su heterozygotes of *Nicotiana tabacum*. - Theor. Appl. Genet., 1983, v. 66, pp. 57-75.
270. Luhrz R., Lorz H. Initiation of morphogenic cell-suspension and protoplast cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). - Planta, 1988, v. 175, pp. 71-81.
271. Malberg Russel L., McIndoo Jean. Ultraviolet mutagenesis and genetic analysis of resistance to methylglyoxal-bis (guanyl-hydrazone) in tobacco. "Mol. and Gen. Genet.", 1984, 196, № 1, pp. 28-34.
272. Manabe Hisashi, Ohira Koji. Selection of D-alanine-tolerant rice cells. "Plant and Cell Physiol.", 1984, 25, № 2, pp. 349-354.
273. Mauney J.R. The culture *in vitro* of immature cotton embryos.- Bot. Gaz., 1961, 122, N 3, pp. 205-209.
274. McCoy T.J. Tissue culture selection for disease resistant plants. Iowa State J. Res. 1988, 62, № 4, pp. 503-521.
275. McCoy T.J., Phillips R.L., Rines H.W. Cytogenetic analysis of plants regenerated from oat (*Avena sativa* L.) tissue cultures: High frequency of partial chromosome loss.-Can. J.Genet. Cytol., 1982, v. 24, pp. 37-50.
276. Meredith C.P., Conner A.J., Schettini T.M. Использование клеточной селекции для получения новых генотипов растений, устойчивых к минеральным стрессам // Iowa State J. Res. 1988. 62. № 4. pp. 523-535.
277. Mohanty B.D., Paul N.K., Ghosh P.D. Chromosomal behaviour in callus culture of *Zea mays* L. Cytologia, 1986, v. 51, №1, pp. 37-41.
278. Mohmand A.S., Nabors M.W. Somaclonal variant plants of wheat derived from mature embryo explants of three genotypes. - Plant Cell Rep., 1990, v.8, № 9, pp. 558-560.
279. Morocz S., Donn G., Nemeth J., Dudits D. An improved system to obtain fertile regenerants via maize protoplasts isolated from a highly embryogenic suspension culture. // Theor. Appl. Genet. 1990. Vol. 80. pp. 721-726.
280. Morrish F.M., Hanna W.W., Vasil I.K. The expression perpetuation of inherent somaclonal variation in regenerants from embryogenic cultures of *Pennisetum glaucum* (L.) R.Br. (pearl. Millet).- Theor. Appl. Genet., 1990, v. 80, pp. 409-416.
281. Muller E., Brown P. T. H., Hartke S., Lorz H. DNA variation in tissue culture derived rice plants. - Theor. Appl. Genet., 1990, pp. 80, p. 673-679.
282. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. - Physiol. Plant., 1962, v. 15, pp. 473-497.
283. Murata M., Orton T. J. Chromosome fusions in cultured cells of cereals. - Can. J. Genet. Cytol., 1984, v. 26, pp. 395-400.
284. Murata M., Orton T. J. Chromosome structural changes in cultured cereals cells. - *In vitro*, 1983, v. 19, pp. 83-89.
285. Nadel Barry, Spiegel-Roy Pinhas. Отбор вариантов, устойчивых к токсину мальсекко в культуре клеток лимона // «Plant Sci.»-1987.53. № 2. pp. 177-182.
286. Nagarajan P., Walton P.D. A comparison of somatic chromosomal instability in tissue culture regenerants from *Medicago media Pers.* - Plant Cell Rep., 1987, v. 6, pp. 109-113.
287. Navratilova B. Micropropagace okurky (*Cucumis sativa* L.) // Bull. VSUZ. Olmouc. 1987. № 31. pp. 35-44.
288. Neal Catherine A., Topoleski Leonard D. Hormonal regulation of growth and development of tomato embryos *in vitro*. - "J. Amer. Soc. Hort. Sci.", 1985, 110, № 6, p. 869-873.
289. Nijzeke M., Naraka M., Akada S. - Callus formation of somatic hybrid of rice and soybean and characteristics of the hybrid callus // 1985.
290. Oqura H., Shimada T. Preliminary reports on shoot dedifferentiation from wheat callus.- Wheat Inform. Serv., 1987, Vol. 45/46, pp. 26-28.
291. Orton T.J. Genetic variation in somatic tissues: Method or madness? - Adv. Plant. Pathol., 1984, v. 2, pp. 153-189.
292. Osifo E.O. Somatic embryogenesis in *Dioscorea*.- J. Plant Physiol., 1988, 133, N 3, pp. 378-380.
293. Pallares P. Premiers resultats de la culture "in vitro" d'ovules non fécondes de cotonnier (*Gossypium hirsutum* L.). "Cotton et fibres trop.", 1984, 39, № 4, pp. 145-152.
294. Patel G.B., Patel C.T. Long staple cotton from hybrid seed of crosses between "hirsutum" and "barbadense" species // Indian cott. Grow. Rew. 1952. Vol. 6. № 4. pp. 205-210.
295. Paul N.K., Ghosh P.D. Cytological behaviour during callus culture of *Zea mays* L. - CIS, 1984, № 37, pp. 6-8.
296. Peschke V.M., Phillips R.L., Gengenbach B.G. Discovery of transposable element activity among progeny of tissue culture derived maize plants // Science. 1987. Vol. 238. pp. 804-807.
297. Peschke V.M., Phillips R.L., Gengenbach B.G. Genetic and mo-

lecular analysis of tissue culture derived Ac elements // Theor. Appl. Genet. 1991. Vol. 82. pp.121-129.

298. Pickering R., Morgan P. Plant regeneration from cultured embryos derived from *Hordeum vulgare* L. pollinated with *H.bulbosum* L. - *Euphytica*, 1983, 32, 2, pp. 583-591.

299. Potrykus I. Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1991. 42. pp. 205-225.

300. Price H. James, Smith Roberta H. Somatic embryogenesis in suspension cultures of *Gossypium klotzchianum* Anderss. "Planta", 1979, 145, № 3, pp. 305-307.

301. Pundir N.S. Experimental embryology of *Gossypium arboreum* L. and their reciprocal crosses.- Bot. Gaz., 1972, Vol., pp. 7-20

302. Rahmankulov S., Daminova D., Rahmankulov M. Ways of developing plants in interspecific hybridisation of cotton.- Cotton Science of konf., China, 2008, pp.52

303. Rossignol L., Rossignol M., Ducreux G., Nozeran R., Darvas A. Analyse de la variabilite d'individus neoformes *in vitro* a partir de cals chez la Pomme de terre (*Solanum tuberosum* L. var. BF 15) "Bull. Soc. Bot. Fr. Lett. Bot.", 1984,131, № 3, pp.171-190.

304. Sacristan M.D. Karyotypic changes in callus cultures from haploid and diploid plants of *Crepis capillaris* (L.) Wallr.- Chromosoma, 1971, v. 33, pp. 273-283.

305. Sacristan M.D. Selection for disease esistance in *Brassica* using *in vitro* techniques. Propagation and long term storage. 1985, pp. 73-77.

306. Saeed N.A., Zafar Y., Malik K.A. A simple procedure of *Gossypium* meristem shoot tip culture // Plant Cell, Tissue and Organ culture. 1997.51. pp. 201-207.

307. Santana N., Reynaldo J., Gonsales M.E. Utilizacion del metodo de superficie de respuesta en la determinacion de dos is optimas de ana, aia y kinetina para la formacion de organs on tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) cultivado *in vitro* // Cult. Trop. 1988. 10. № 3. pp. 11-18.

308. Sator Christine. Regeneration van Lumpen-pflanzen Embryonen.-"Landbauforsch. Vlnenrode", 1985, 35, №1, pp. 1-4.

309. Schafer-Menubr A., Czerwinski T., Busman A. Der Einsatz von Embriokultur zur Gewinnung von Artbastarden aus der Kreuzung *Lupinus mutabilis* hartwegii // Landbauforsch. Volkenrode. 1988. 38. № 3. pp. 173-177.

310. Schuetze R., Leike H., Schlegel H. Selektion von resistenten Mutanten in Zellkulturen. "Fortschritter. Landvirt. Und Nahrungsguterwirt.", 1984, 22, № 1, 48 p.

311. Shamina Z.B. The mutation Process: Mechanism of Mutation and Inducing Factors.- Proc. Symp., 1966, pp.377-380.

312. Sharma H.S., Gill B.S. Effect of embrio age and culture media on plant growth and vernalization response in winter wheat. -"Euphytica". 1982, 31, №3, pp. 629-634.

313. Shoemaker R.C., Christofferson S.E., Galbraith D.W. Storage protein accumulation patterns in somatic embryos of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Cell Reports, 1987, 6, pp. 12-15.

314. Shoemaker R.C., Couche L.G., Galbraith D.W. Charactrization of somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*G.hirsutum* L.). "Plant Cell Repts.", 1986, 5, № 3, pp. 178-181.

315. Singh R.J. Chromosomal variation in immature embryo derived calluses of barley (*Hordeum vulgare* L.). - Theor. Appl. Genet., 1986, v. 72, № 5, pp. 710-716.

316. Skovsted A. Cytological studies in cotton. I. The mitosis and the meiosis in diploid and triploid Asiatic cotton.- Ann. Bot., 1933, 47, 286, pp. 227-251.

317. Skovsted A. Chromosoma comjigation in interspecific hybrids.- Jour. Genet., 1937, 34(1).

318. Smith R.H., Price H. James, Thaxton J.B. Defined conditions for the initiation and growth of cotton callus *in vitro*. I. *Gossypium arboreum*. "In vitro", 1977, 13, №5, pp. 329-334.

319. Srinivasan Rao N.K., Vasil E.N. Differentiation of plantlets in hybrid embryo callus of pineapple // "Sci. hort", 1986. 15. № 3. pp. 235-238.

320. Stephens S.G. Colchicine - produced polyploids in *Gossypium*. I. An: autotetraploid Asiatic cotton and certain of its hybrids with wild diploid species // Journ. Genet. 1942. Vol. 44. 2/3. pp. 272-295.

321. Stewart J.McD, Hsu C.L. In ovulo emryo culture and seedling development of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Planta, 1977, 137, pp. 113-117

322. Sunderland N. Anther culture a progress report. - Sci. Prog. Oxford, 1971,v.59, pp.527-549.

323. Sunderland N. Nuclear cytology. - In "Plant tissue and cell culture". Blackwell, Oxford, 1977, pp. 177-205.

324. Teoule E., Dattee U.- Procède d'obtention d'hybrides somatiques de luzernes par fusion de protoplasts.- Lad. D'amerlioration des createbrs de verietes fourragares. 1983, pp. 327-332.

325. Tewary P.K., Gypta B.K., Subba R.G. In vitro studies on the growth rate of callus of mulberry (*Morus alba* L.) // Indian J. Forest. 1989. 12. № 1. pp.34-35.

326. *Thanutong P., Furusawa I., Yamamoto M.* Resistant tobacco plants from protoplast derived calluses selected for their resistance to *Pseudomonas* and *Alternaria* toxins. "Theor. And Appl. Genet.", 1983, 66, № 3-4, pp. 209-215.

327. *Thomas B., Pratt D.* Использование метода культуры клеток для получения мутантов, устойчивых к гербицидам // США. Herbicide tolerance. -California Agriculture, 1982, 36, 8, pp. 33.

328. *Toki-Seiichi, Kameya Toshiaki.* The use of streptomycin resistance and chlorophyll deficiency for selection of somatic hybrids between tobacco and *N. rustica*. "Heredity", 1988, 60, №1, pp. 1-5.

329. *Tcyoda H., Hayashi H., Yamamoto K., Hirai T.* Selection of resistant tomato calli to fusaric acid. Ann. Phytopathol. Soc. Japan. 1984, 50, 4, p. 538-540.

330. *Toyoda Hideyoshi, Chatani Kazuyuki, Matsuda Yoshinori, Ouchi Seiji.* Multiplication of tobacco mosaic virus in tobacco callus tissues and *in vitro* selection for viral disease resistance. Plant Cell Repts. 1989, 8, № 8, pp. 433-436.

331. *Trolinder N.L., Goodin J.R.* Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Plant Cell reports, 1987, 6, pp. 231-234.

332. *Trolinder N. L., Goodin J.R.* Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*). II. Requirement for embryo development and plant regeneration. "Plant Cell, Tissue and Organ Cult.", 1988, 12, №1, pp. 43-53.

333. *Trolinder N. L., Goodin J.R.* Somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium*). I. Effects of source of explant and hormone regime. "Plant Cell, Tissue and Organ Cult.", 1988 a, 12, № 1, pp. 31-42.

334. *Vasil J.K.* Developing cell and tissue systems for improvement of cereal and grass crops. - J. Plant physiol., 1987, Vol.128, pp. 193-218.

335. *Webb D.T., Flinn B.S., Georgie W.* Micropropagation of eastern white pine (*Pinus strobes* L.) // Can. J. Forest Res. 1988. 18. № 12. pp. 1570-1580.

336. *Webber J.M.* Interspecific hybridization in *Gossypium* and the metodic behaviour of F_1 plants. - J. Agric. Rev., 1935, 51, 12. pp. 1047-1070.

337. *Wersuhn G., Fritze G.* Selektion HgCl-toleranter linien aus Zellkulturen der Kartoffel. Potato Res., 1985, 28, 3, pp. 435-438.

338. *Yano Shin-ichi, Ogawa Masahiro, Yamada Yasuyuki.* Образование растений из клеток риса, устойчивых к солям // Plant Tissue Cult. Tokyo. 1982. pp. 495-496.

339. *Zakri A.H.* Индуцирование и отбор устойчивых к алюминию

вариантов сои в культуре клеток // "Nucl. Techn. and *in vitro* Cult. Plant Improv. Proc. Int. Symp.". Vienna. 1986. pp. 267-273.

340. *Zapata F.J., Ella E.S.* Specific gravity of the grain a factor to consider in rice tissue culture // Plant Physiol. 1988. 132. № 3, pp. 294-297.

341. *Zehr B.E., Williams M.E., Duncan D.R., Widholm J.M.* Somaclonal variation in the progeny of plants regenerated from plants regenerated from callus cultures of seven inbred lines of maize. -Can. J. Bot., 1987, v. 65, pp. 491-499.

342. *Zhang B.H.* A rapid induction method for cotton somatic embryos. // Chinese Sci. Bull. 1994. 39. pp.1340-1342.

343. *Zhang B.H., Li X.L., Li F.L., Li F.G.* Development of abnormal plantlets and their normalization during cotton tissue culture // Acta Botanica Sinica. 1996. 38. pp. 845-852.

344. *Zhang B.H., Feng R., Liu F., Wang Q.* High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite Chinese cotton variety // Bot. Acad. Sin. 2001. 42. pp. 9-16.

345. *Zok S.* Multiplication vegetative *in vitro* par culture d'apex chez les cafeirs *Coffea aralia* L. // 12 Collog. Sci int café. Montreux. 1987. pp. 791-800.

ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр.
Предисловие	3
Принятые сокращения.....	6
Глава 1. Коротко о биотехнологии	7
Глава 2. Культура <i>in vitro</i> органов и тканей растений и перспективы её использования	19
2.1. Культура <i>in vitro</i> зародышей и органов растений	21
2.2. Культура меристем растений.....	23
2.3. Культура каллусных клеток.....	24
2.4. Культура тканей	25
Глава 3. Рост и развитие <i>in vitro</i> недозрелых гибридных зародышей хлопчатника	27
3.1. Пересадка в грунт пробирочных растений, полученных методом эмбриокультуры	36
Глава 4. Разработка способа преодоления нескрещиваемости у хлопчатника с помощью экзогенных фитогормонов	39
4.1. Явление несовместимости у двудольных растений ...	39
4.2. Воздействие экзогенных фитогормонов на развитие и функции клеток и тканей растений	43
4.3. Сохранение завязей в зависимости от возраста в период обработки фитогормонами	48
4.4. Влияние экзогенных фитогормонов на формирование семян при гибридизации <i>G.hirsutum L. x G.raimondii Ulbr.</i> ..	51
4.5. Влияние экзогенных фитогормонов на формирование семян при гибридизации <i>G.hirsutum L. x G.thurberi Tod</i>	55
4.6. Влияние экзогенных фитогормонов на формирование семян при гибридизации <i>G.hirsutum L. x G.anomalum Waw.</i> ..	63
4.7. Влияние экзогенных фитогормонов на рост разновозрастных зародышей хлопчатника	67
4.8. Влияние экзогенных фитогормонов на формирование семян при гибридизации <i>G.hirsutum L. x G.sturtii F. Müell.</i> ..	73
4.9. Распределение меченого фитогормона в генеративных органах при обработке завязей хлопчатника	83

4.10. Изучение влияния экзогенных фитогормонов на цитозембриологические процессы при разнохромосомной гибридизации хлопчатника	85
Глава 5. Различные способы получения отдаленных межвидовых гибридов хлопчатника.....	93
5.1. Гормональная регуляция эмбриогенеза <i>in vitro</i> при гибридизации <i>G.arboreum L. x G.hirsutum L., G.herbaceum L. x G.hirsutum L.</i>	93
5.2. Получение гибридов между <i>G.hirsutum L.</i> и <i>G.klotzschianum Anderss., G.davidsonii Kell.</i>	96
Глава 6. Получение амфидиплоидов хлопчатника и их беккросс-потомства	102
6.1. Изучение хозяйственно-ценных признаков и технологических показателей волокна у беккросс-поколений амфидиплоидов	110
Глава 7. Солеустойчивость культурных растений	126
Глава 8. Каллусогенез и соматический эмбриогенез у хлопчатника	137
Глава 9. Биология культивируемых клеток хлопчатника на селективных средах с NaCl	156
9.1. Культура <i>in vitro</i> ткани гипокотыля хлопчатника на засоленных средах с NaCl	157
9.2. Суспензионная культура клеток хлопчатника на засоленных средах	161
9.3. Проведение клеточной селекции на солеустойчивость	183
Глава 10. Результаты изучения новых линий хлопчатника по хозяйственно-ценным признакам и на солеустойчивость	188
Закключение	205
Выводы и рекомендации	208
Список использованной литературы	212

**С.-А.Рахманкулов, А.Азизходжаев,
Д.М.Даминова, М.С.Рахманкулов**

НЕТРАДИЦИОННЫЕ МЕТОДЫ В СЕЛЕКЦИИ ХЛОПЧАТНИКА

*Утверждено к печати Ученым советом Узбекского
научно-исследовательского института селекции и семеноводства
хлопчатника Министерства сельского и водного хозяйства
Республики Узбекистан*

**Редактор: А.С.Михерева
Корректор: К.Загряжская**

Изд. № 3-127. Сдано в набор 07.08.2009. Подписано в печать 28.09.2009.
Формат 60х84^{1/16}. Уч.-изд. л. 12,0. Тираж 120. Заказ № 192.
Цена договорная.

Издательство «Фан» АН РУз: 100170, Ташкент, ул. И.Мунинова, 9.

Отпечатано в типографии ООО «КО‘НИ-NUR».
г.Ташкент, массив Машинасозлар, 4.

Земля

увб 20234

ISBN 978-9943-09-873-2



9 789943 098732