

Е. А. Долматов
В. Е. Джафарова
Г. А. Седышева

СТИМУЛЯТИВНЫЙ АПОМИКСИС И ПРОБЛЕМА ПОЛУЧЕНИЯ ГАПЛОИДОВ И ГОМОЗИГОТНЫХ ДИПЛОИДОВ У ГРУШИ

УДК 632.25:634.11:58.08

Аннотация

В статье приводятся результаты исследований по стимулятивному апомиксису у груши и использованию его для получения гаплоидов и гомозиготных диплоидов. В задачи исследований входило:

- выявление сортов груши, склонных к стимулятивному апомиксису;
- выяснение характера расщепления признаков у апомиктических семян груши;
- поиск среди представителей подсемейства *Pomoideae* растений, пыльца которых обладала бы наибольшим стимулирующим эффектом;
- отработка методики выращивания незрелых апомиктических семян с целью увеличения выхода гаплоидов;

Было установлено, что более 50% сортов груши, из использованных в опыте, при несостоявшейся отдаленной гибридизации с представителями других родов подсемейства *Pomoideae* способны образовывать семена апомиктического происхождения, дающие в большинстве случаев начало диплоидным растениям. Их количество в сильной степени зависит от генотипических особенностей материнского растения и в отдельных комбинациях может достигать 25% от числа опыленных цветков.

Выделены генотипы с максимальной склонностью к апомиксису: 29-4, 40-4, Бретфелпс, 24-50-98, 24-59-255, Белорусская поздняя, Майкопская красавица, Дружба и другие.

С использованием генетических маркеров было установлено, что начало апомиктическим семенам дают зародышевые мешки, в которых состоялся мейоз. Практически все растения имели диплоидный набор хромосом, и только одно было гаплоидом. Следует отметить, что появление гаплоидов и диплоидов в потомствах сортов груши обусловлено одним и тем же процессом, оканчивающимся на разных этапах. В первом случае гаплоидная яйцеклетка приступает к делению и дает начало гаплоидному растению. Во втором – восстановление диплоидности происходит в результате первого деления

партеногенетически развивающейся гаплоидной яйцеклетки не сопровождающимся цитокинезом.

На втором этапе с целью увеличения выхода гаплоидов незрелые апомиктические семена извлекались из 55...70 дневных завязей и выращивались в культуре *in vitro*. Цитологически было изучено 6 образцов из комбинации Белорусская поздняя x Хеномелес японский и 3 – из комбинации 9-61-65(Лимонка x Ильинка) x Хеномелес японский. Большинство образцов в соматических клетках имеют диплоидный набор хромосом ($2n=2x=34$). И лишь в двух образцах – №1 и №8 – в отдельных точках роста отмечено наличие метафазных пластинок с числом хромосом, равным 17, т.е. гаплоидным. Следует отметить, что у образца №1 гаплоидный набор хромосом отмечен в эпидермальных клетках. У образца №8 – в двух случаях в меристематических клетках только метафазы с 17 хромосомами, а в двух как гаплоидные метафазы, так и диплоидные. По всей вероятности два последних образца являются миксоплоидными химерами.

В настоящее время выжившие зародыши размножены. Общее количество копий (пробирок с конгломератами) составляет 1212 штук, при среднем количестве почек и побегов от 7 до 12 штук в конгломерате. Образцы, имеющие гаплоидный набор хромосом – №8 (Белорусская поздняя x Хеномелес японский) и № 1 (Белорусская поздняя x Хеномелес японский) представлены, соответственно, 352 и 378 копиями.

Ключевые слова: стимулятивный партеногенез, гаплоид.

E. A. Dolmatov
V. E. Dzhafarova
G. A. Sedysheva

STIMULATIVE APOMIXES AND PROBLEM OF OBTAINING PEAR HAPLOIDS AND HOMOZYGOUS DIPLOIDS

Abstract

Stimulative apomixis in pear and its use for obtaining haploids was investigated. The results of this investigation are given in this paper. The goals of the study were the following:

- to reveal pear varieties inclined to the stimulative apomixis;
- to determine the character of trait segregation in pear seedlings occurred as a result of the stimulative apomixis;
- to search among the representatives of plant subfamily *Pomoideae*, the pollen of which could have the highest stimulative effect;

- to develop the methods of cultivation of immature apomictic seeds with the aim of increasing of a haploid output;

It was stated that a substantial part of pear varieties (over 50%) from the used ones in that experiment under the non-performed remote hybridization with representatives of other lines of *Pomoideae* subfamily was capable to form seeds of apomictic origin. In most cases they resulted in diploid plants. Their number rather depended on the genotypic peculiarities of the maternal plant and in certain combinations it might reach 25% from a number of pollinated flowers.

Genotypes having the highest possible inclination to the apomixis were singled out: 29-4, 40-4, «Bretfelps», 24-50-98, 24-59-255, «Belorusskaya pozdnia», «Maikopskaya krasavitsa», «Druzhba» and others.

Having used genetic markers we discovered that embryo sacks, in which meiosis occurred, initiated apomictic seeds. Actually, all plants had a diploid set of chromosomes but only one was a haploid. It should be noted that haploid and diploid occurring in the progenies of pear varieties was stipulated by one and the same process terminating on different stages. In the first case, a haploid ovule started dividing and initiated a haploid plant. In the second case, the restoration of diploidy occurred as a result of the first division of a parthenogenetically developing haploid ovule.

On the second stage with the aim of haploid output increasing, the immature apomictic seeds were extracted from ovaries of 55...60 days old and were cultivated *in vitro*. 9 samples from the combination «Belorusskaya pozdnia» x *Chaenomeles Japanese* were studied cytologically. The majority of samples in the somatic cells had a diploid set of chromosomes ($2n=2x=34$); and only in two samples – № 1 and №8 – in certain points of growth there was noted a presence of metaphase plates with a chromosome number of 17, i.e. haploid. It should be noted that in sample № 1 the haploid set of chromosomes was noticed in epidermal cells. In sample № 8 in two cases in meristematic cells were noticed only metaphases with 17 chromosomes; and in other two cases were noticed both haploid metaphases and diploid ones. Probably, the two latter samples were chimaeras.

At present the survived germs have been propagated. The total quantity of copies (test-tubes with conglomeration) runs to 1212 pieces, while the average number of buds and shoots is from 7 to 12 pieces in the conglomeration. The samples having haploid set of chromosomes № 8 («Belorusskaya pozdnia» x *Chaenomeles Japanese*) and № 1 («Belorusskaya pozdnia» x *Chaenomeles Japanese*) are presented with 352 and 378 copies, respectively.

Key words: stimulative parthenogenesis, haploid.

Селекция плодовых растений в силу многих причин – процесс очень длительный и дорогостоящий. Поэтому проблема подбора исходного материала для скрещиваний, базирующаяся на глубоких селекционно-генетических и биологических исследованиях, является одной из самых значимых, так как, в конечном итоге, определяет эффективность той или иной селекционной программы. Важная роль при этом отводится созданию и вовлечению в селекционный процесс новых комплексных источников и доноров хозяйственно-ценных признаков, представляющих собой высокогомозиготные формы. Их использование в селекционной практике дает возможность резко сократить объемы гибридных семей, осуществить переход к скрещиваниям контролируемым на уровне гамет и заранее прогнозировать результаты скрещиваний [1].

У плодовых растений получение таких форм в результате длительного инцухта практически неосуществимо, т.к. к самостерильности, инбредной депрессии и необходимости принудительного самоопыления в течение 9...10 поколений добавляется еще и продолжительный ювенильный период. Поэтому почти единственной возможностью создания гомозиготных форм у многолетних древесных растений является использование для этих целей гаплоидов [2].

Получение гаплоидов посредством культуры пыльников или через гаплоидный апомиксис стало довольно обычным явлением в селекции многих сельскохозяйственных культур, однако у плодовых оба эти направления находятся в стадии разработки. Исследования по культуре пыльников вишни и яблони проводятся во Франции, Китае, Японии, и Германии [3, 4, 5,]. В нашей стране по этому пути идут ученые из ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина [6].

Наиболее значимые работы по гаплоидному партеногенезу яблони осуществляются во Франции и Китае [7, 8, 9, 10].

На практике для стимуляции партеногенеза в большинстве случаев используют пыльцу, которая не способна произвести нормальное двойное оплодотворение (пыльца, обработанная у-лучами, различными химическими веществами или пыльца другого, но родственного вида или рода). Выход гаплоидов при этом может достигать до 20...50% от числа опыленных цветков [11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18].

В целом ряде работ обосновывается возможность получения высокогомозиготных диплоидов через псевдодиплоидный апомиксис, связанный со спонтанным удвоением числа хромосом при первом делении ядра партеногенетически развивающейся гаплоидной яйцеклетки, не сопровождающимся цитокинезом [19].

Успешное использование апомиксиса в создании чистых линий у однолетних культур и интенсивно ведущиеся в этом направлении эксперименты по плодовым за рубежом послужили причиной для

развертывания с 1983 года соответствующих исследований во Всероссийском НИИ селекции плодовых культур.

Основные усилия в работе были направлены на решение следующих задач:

- выявление сортов груши, склонных к стимулятивному апомиксису;
- выяснение характера расщепления признаков у сеянцев груши, возникших в результате стимулятивного апомиксиса;
- поиск среди представителей подсемейства *Pomoideae* растений, пыльца которых обладала бы наибольшим стимулирующим эффектом;
- отработку методики выращивания незрелых апомиктических семян с целью увеличения выхода гаплоидов;

За время исследований было осуществлено 80 комбинаций скрещиваний (в т.ч. и рекогносцировочных) общим объемом 46000 цветков, из которых 28000 приходится на скрещивания «груша х Хеномелес японский», 7700 – на «груша х ирга колосистая», 5500 – на «груша х яблоня», и 4800 – на «груша х айва обыкновенная».

Опыление цветков, кастрированных в стадии рыхлого бутона, проводилось свежесобранной пылью с последующим укрытием изоляторами из пергаментной бумаги или плотной синтетической ткани.

Исходным материалом для исследований на этапе культивирования *in vitro* служили плодики из семей Белорусская поздняя Х хеномелес японский и 9-61-65 (Лимонка х Ильинка) х Хеномелес японский в возрасте 55 и 70 дней с момента опыления. В каждой семье отбирали по 10 плодиков.

Стерилизацию плодиков проводили по схеме: 1) 1 час в проточной воде; 2) 15 мин. в 0,01% р-ре мертиолята; 3) 3-х кратное промывание в стерильной дистиллированной воде по 10 минут. Перед извлечением из них семян с зародышами дополнительно обжигали в пламени 96° этилового спирта в асептических условиях бокса.

Семена, а затем извлеченные из них зародыши (после 2 месяцев хранения в условиях пониженных температур, +3...+5°C) высевали на среду Смирнова, дополненную тиамином 10мг/л, дрожжевым экстрактом – 20 мл/л (по Р. Г. Бутенко [1964]), гидролизатом казеина 400мг/л, ГК – 2 мг/л, кинетином – 0,2мг/л, мезоинозитом – 150мг/л, сахарозой – 4%. Размножение апомиктических зародышей проводили на среде Мурасиге-Скуга.

Пассированные зародыши культивировали в культуральной комнате при температуре 24...26°C, освещенности 3,0...3,5 тыс. лк. и 16-часовом фотопериоде.

Цитологический анализ меристематических тканей вегетативных побегов, выращенных в культуре *in vitro* из апомиктических зародышей,

проводили в лаборатории цитозембриологии ГНУ ВНИИСПК на временных давленных препаратах.

Фиксация микропобегов в уксусном спирте (3 части 96% этилового спирта + 1 часть ледяной уксусной кислоты). Окраска пропионовым лакмоидом (Каптарь, 1967; Седышева, 1990). Препараты просматривали на микроскопе Nikon-50i с фотокамерой DS-Fi1.

Результаты исследований

На первом этапе исследований [20, 21, 22, 23] было установлено, что значительная часть сортов груши (более 50%) из использованных в опыте при несостоявшейся отдаленной гибридизации с представителями других родов подсемейства *Pomoideae* способна образовывать семена апомиктического происхождения, дающие в большинстве случаев начало диплоидным растениям. Их количество в сильной степени зависит от генотипических особенностей материнского растения и в отдельных комбинациях может достигать 25% от числа опыленных цветков.

В результате изучения проявления стимулятивного апомиксиса у 80 сортов груши различного генетического происхождения выделены генотипы с максимальной склонностью к апомиксису: 29-4, 40-4, Бретфелпс, 24-50-98, 24-59-255, Белорусская поздняя, Майкопская красавица, Дружба и другие. Показано, что некоторые апомиктические сеянцы в такой же степени склонны к апомиксису, как и материнские растения.

При стимуляции апомиксиса у груши с помощью пыльцы ирги, айвы обыкновенной и хеномелеса японского образование семян происходило в 50% случаев, а пыльцой яблони – в 30%.

Следует отметить, что при использовании пыльцы хеномелеса японского идентификация апомиктических и гибридных сеянцев возможна на ранних этапах онтогенеза по маркерным признакам (у гибридных растений уже в фазе первых 2...3 настоящих листьев хорошо просматриваются крупные почковидные прилистники, а у апомиктических – прилистники шиловидные). В связи с чем применение пыльцы хеномелеса японского более предпочтительно.

Апомиктическим сеянцам груши, полученным в результате чужеродного опыления, в пределах одной и той же комбинации присуще большое морфологическое разнообразие. Эти различия затрагивали признаки листьев, побегов, габитуса растений, признаки плодов, устойчивости к болезням и другие. В плодоносящем состоянии апомикты, происходящие от одного материнского растения, отличались друг от друга (и соответственно от материнского растения) в той же степени, в какой отличаются гибридные сеянцы одной семьи.

Для выяснения причин столь высокой морфологической неоднородности у гетерозиготного по гену С (красная окраска листьев, плодов) сеянца груши при стимуляции пыльцой хеномелеса японского было получено апомиктическое потомство, состоящее из 2 типов растений – одни были с зелеными, другие – с пурпурными листьями. Таким образом, с использованием генетических маркеров по ращеплению в потомстве было установлено, что начало апомиктическим семенам дают зародышевые мешки, в которых состоялся мейоз. Если бы это было не так, то все сеянцы были бы пурпурными. Практически все растения имели диплоидный набор хромосом, и только одно было гаплоидом. Оно было обнаружено в 1998 году в гибридной школке среди апомиктических сеянцев.

При этом следует отметить, что появление гаплоидов и диплоидов в потомствах сортов груши обусловлено, по сути дела, одним и тем же процессом, оканчивающимся на разных этапах. В первом случае гаплоидная яйцеклетка приступает к делению и дает начало гаплоидному растению. Во втором – восстановление диплоидности происходит в результате первого деления партеногенетически развивающейся гаплоидной яйцеклетки не сопровождающегося цитокинезом. В этом случае мы сразу же получаем удвоенный гаплоид, представляющий собой полностью гомозиготное растение [20, 21, 22, 23]. В настоящее время в селекционных садах института имеются плодоносящие апомиктические растения груши.

На втором этапе с целью увеличения выхода гаплоидов незрелые апомиктические семена извлекались из 55...70 дневных плодиков и выращивались в культуре *in vitro*. В этот период, как известно, зародыши семечковых культур полностью сформированы и дифференцированы.

Количество зародышей, извлеченных из выполненных семян, оказалось в 1,6...2,8 раза меньше, чем общее число семян. В среднем они были от 1 до 5 мм длиной, имели белую или зеленоватую окраску или были прозрачными. Семена, в которых не обнаружены зародыши, были заполнены прозрачным желеобразным эндоспермом. Зародыши, извлеченные из щуплых семян, размером до 2 мм, прозрачные и при культивировании на питательной среде погибали.

Независимо от возраста зародышей за 45-дневный период культивирования наблюдали отклонения в их развитии. Установлено, что количество проростков одновременно с аномалиями побегов и корней может достигать 50%. Проростки без аномалий достигали в высоту от 5 до 20 мм, количество листочков от 2 до 8 штук, а длина корешков – от 6 до 33 мм. В нестерильных условиях подобные проростки погибали. В связи с чем в дальнейшем их необходимо было размножить.

Апикальное доминирование на этапе микроразмножения снимали введением в питательную среду 6-БАП. Получение наибольшего количества побегов от каждого зародыша достигалось чередованием концентраций цитокинина в дозе 1 мг/л и 2 мг/л на фоне 1,5 мг/л ГК. Подобное чередование 6-бензиламинопурина стимулировало образование и рост дополнительных почек и побегов. На этапе размножения формировались конгломераты, состоящие из 10...14 идентичных побегов, причём большая часть из них была пригодна к укоренению (рисунок 1).



Рисунок 1 – Апомиктический образец №1 на этапе микроразмножения

На этапе укоренения апомиктических побегов более эффективным оказалось добавление в среду ИУК в количестве 1 мг/л. Укореняемость микропобегов достигала 80...87% (рисунок 2).



Рисунок 2 – Апомиктические микропобеги образца №5 на этапе ризогенеза

Наиболее сложный этап клонального микроразмножения апомиктических растений груши – переход растений из *in vitro* в *in vivo*. Использование общепринятой техники адаптации укоренённых микропобегов к почвенным условиям дало всего 50,5% прижившихся растений (рисунок 3).



Рисунок 3 – Адаптированные апомиктические растения

Чтобы повысить выживаемость растений использовали прививку побегов *in vitro* на нестерильные подвои груши обыкновенной. Прививку проводили в период активного роста подвоя на зеленую часть растущего побега в расщеп. Прививка на подвои, выращенные в открытом грунте и пересаженные в условия искусственного освещения, результативна до 54%, а прививка на подвои, выращенные в условиях искусственного освещения, достигает 80%.

Цитологически было изучено 6 образцов из комбинации Белорусская поздняя x Хеномелес японский – №№ 8,10,12,16,17 и 22 и 3 образца из комбинации 9-61-65 x Хеномелес японский – №№ 1,5,7. У каждого образца анализировали от 1 до 38 верхушечных меристем. Большинство образцов в соматических клетках имеют диплоидный набор хромосом ($2n=2x=34$). И лишь в двух образцах – №1 и №8 – в отдельных точках роста отмечено наличие метафазных пластинок с числом хромосом, равным 17, т.е. гаплоидным. Следует отметить, что у образца №1 гаплоидный набор хромосом отмечен в эпидермальных клетках (рисунок 4).

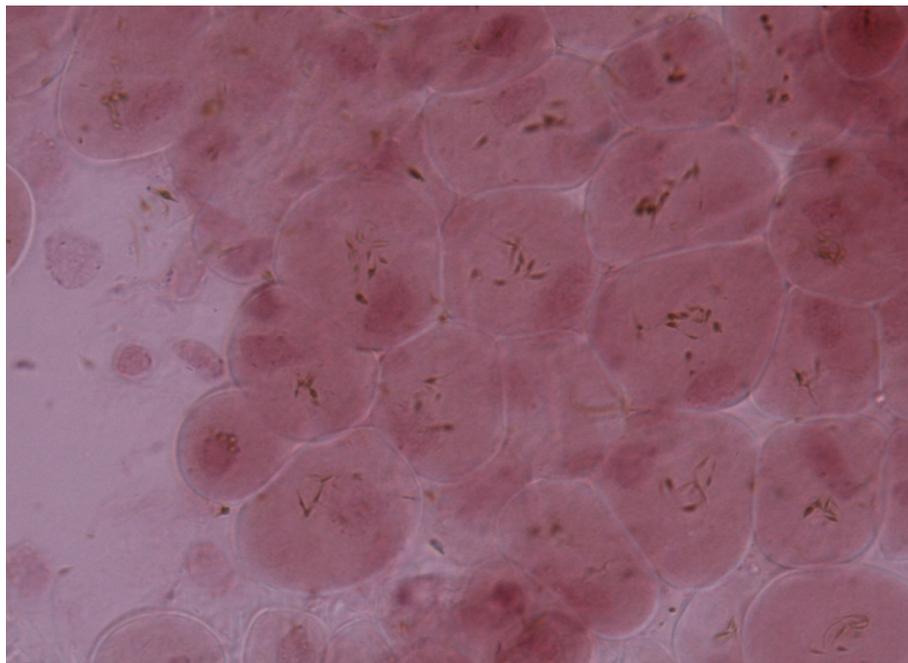


Рисунок 4 – Образец №1 с гаплоидным набором хромосом
в эпидермальных клетках

У образца №8 в двух случаях в меристематических клетках только метафазы с 17 хромосомами, а в двух как гаплоидные метафазы, так и диплоидные. По всей вероятности два последних образца являются химерами, что может свидетельствовать о том, что процесс удвоения хромосом у гаплоидного растения может происходить спонтанно.

Кроме того, в большинстве микропобегов образца №8 отмечено много уродливых замыкающих клеток устьиц, что в свою очередь, свидетельствует о нарушении процесса дифференциации тканей вследствие несбалансированного набора хромосом.

Таким образом, цитологический анализ образцов апомиктических форм подтверждает наличие у груши стимулятивного гаплоидного партеногенеза и принципиальную возможность получения гаплоидов.

В настоящее время выжившие зародыши размножены. Общее количество копий (пробирок с конгломератами) составляет 1212 штук, при среднем количестве почек и побегов от 7 до 12 штук в конгломерате. Образцы, имеющие гаплоидный набор хромосом – №8 (Белорусская поздняя x Хеномелес японский) и № 1 (9-61-65 x Хеномелес японский) представлены, соответственно, 352 и 378 копиями, что открывает большие возможности для экспериментов по получению полностью гомозиготных растений и использованию их в селекционном процессе.

Выводы

1. На первом этапе исследований было установлено, что значительная часть сортов груши (более 50%) из использованных в опыте

при опылении пылью отдаленных родов подсемейства Pomoideae способна образовывать семена апомиктического происхождения, дающие в большинстве случаев начало диплоидным растениям. Их количество в сильной степени зависит от генотипических особенностей материнского растения, и в отдельных комбинациях может достигать 25% от числа опыленных цветков.

2. Опыление груши пылью ирги, айвы обыкновенной и хеномелеса японского вызывало образование апомиктических семян в 50% случаев, а пылью яблони – в 30%. При этом в комбинациях с хеномелесом японским была возможна идентификация апомиктических и гибридных сеянцев на ранних этапах онтогенеза по маркерным признакам. В связи с чем использование пыли хеномелеса японского более предпочтительно.

3. Апомиктическим сеянцам груши, полученным в результате чужеродного опыления, в пределах одной и той же комбинации присуще большое морфологическое разнообразие, обусловленное механизмом образования семян

4. С использованием генетических маркеров было установлено, что начало апомиктическим семенам дают зародышевые мешки, в которых состоялся мейоз, а апомиктические растения могут представлять собой удвоенные гаплоиды.

5. Использование культуры *in vitro* позволило получить два образца апомиктических миксоплоидных растений, содержащих как гаплоидные, так и диплоидные клетки и размножить их в количестве 352 и 378 копий, что в перспективе даст возможность получить полностью гомозиготные растения для использования их в селекционном процессе.

Литература

1. Навашин М.С. Новая возможность в селекции // Селекция и семеноводство. – 1933 – № 2 – С.11-16.
2. Хохлов С.С., Тырнов В.С., Гришина Е.В. и др. Гаплоидия и селекция, – М., Наука, 1976 – 222 с.
3. Murahami Y. Biotechnology of fruit trees // Farmg. Japan. – 1987. – Vol.21. – N1. – P.27-36.
4. Dayan Wang, Gao-lin Gui, Jang San Sun. Tissue culture of . fruit crops in China // Hortscience – 1988. – Vol.23. – N6. – P. 962-965.
5. Hanre V. Nutzung biotechnologisches Verfahren fur die Obstzuchtung // Landwirtschaftswissenschaft – 1990 – N.292. – S. 193-199
6. Жуков О.С, Олейникова О.Я., Савельев Н.И. Методические рекомендации по получению растений регенератов плодовых пород в культуре пыльников. – Мичуринск, 1994. – 36 с.

7. Lespinasse Y., Godicheau M., Duron M. Potential value and method of producing haploids in the apple tree *Malus pumila* Mill// *Acta Horticulturae*. – 1983. – Vol.131. – P.223-230.
8. Lespinasse Y., Noiton D. Contribution a l'etuda d'une plante haploide de pommier (*Malus pumila* Mill.)// *Agronomie*.1986. – Vol.6. – N2. – P.659-664.
9. Lespinasse Y., Chevreau E. Progressi del miglioramento genetico del melo: cloni autocompactibili e piante aploidi// *Riv. frutticolt.- e. ortofloricolt* – 1987. – Vol. 49. – N8. – P.25-29.
10. Zhang J.X., Lespinasse Y., Chevreau E. Obtention de plantes haploides de pommier (*Malus domestica* Borkh) issues de parthenogenese induite in situ par du pollen irradie et culture *in vitro* des pepins immatures// *C.r.Acad.sci*. – 1988. – Vol.307. – P.451-457.
11. Laurie D.A., Bennett M.D. The production of haploid wheat plants from wheat x maize cross// *Theor.Appl. Genet* . – 1988. – Vol.76. – P.393-397.
12. Sitch L.A., Snape J.W. Factors affecting haploid production in wheat using the *Hordeum bulbosum* system. Postfertilization effects on embryo survival// *Euphytica*. – 1987. – Vol.36. – N3. – P.763-773.
13. Inagaki M., Henry Y., Buyser J. Comparison of haploid production efficiency through anther culture and intergenetic crossing in three wheat varieties and their F1 hybrids//*Japan J. Breeding*. – 1987. – Vol.57. – N4. – P.474-
14. Suenaga K., Nakajime K. Efficient production through crosses between Japanense wheat and maize (*Zea mays*7)// *Plant Cell Reports* – 1989. – Vol.8. – P.263-266.
15. Дунаева С.Е. Использование различных клонов, в качестве опыли телей для получения гаплоидов культурного ячменя //Научно-техн. бюлл.ВНИИР. – 1990 – №204. – С.12-16.
16. Чистякова В.Н., Неттевич Э.Д, Гуляев Т.В. Экспериментальная гаплоидия как средство интенсификации генетико-селекционных работ //Совершенствование селекционно-генетических процессов при выведении сортов зерновых и зернобобовых культур в Нечерноземной зоне. – Москва, 1990. – С.3-12
17. Духарев Н.А. Возможности использования отдаленной гибридизации для получения гаплоидов пшеницы //Биологические основы селекции. – Саратов, 1991 – С.44-54.
18. Вилкова Н.А., Рябченко Н.А. Роль гаплоидии в стабилизации устойчивых к вредителям генотипов ячменя //Всесоюзн. симпозиум «Новые методы биотехнологии растений», Пущино. 20-22 ноября 1991, Тез. докладов – Пущино, 1991, – С.90.
19. Чистякова В.Н. Метод ускоренного получения гомозиготных линий мягкой пшеницы и неполных 56 хромосомных пшенично-пырейных амфидиплоидов при внутривидовой гибридизации//Совершенствование

селекционно-генетических методов при выведении сортов зерновых и зернобобовых культур в Нечерноземной зоне. – М.,1990. – С.3-12.

20. Долматов Е.А. Стимулятивный апомиксис и проблема получения гомозиготных растений у груши // Селекция и сорторазведение садовых культур. – Орел: ВНИИСПК, 1996. – С.11-123.

21. Долматов Е.А. Апомиксис у груши и перспективы его использования // На благо отечественного садоводства (150 лет Всероссийскому НИИ селекции плодовых культур). – Орел: «Тургеневский бережок», 1996. – С.165-167.

22. Долматов Е.А., Панова Н.И. Апомиксис и экспериментальная гаплоидия у груши // Селекция и сорторазведение садовых культур – Орел: ВНИИСПК, 1998. – С.276-280.

23. Долматов Е.А., Седов Е.Н., Панова Н.И., Седышева Г.А. Изучение морфологической неоднородности апомиктического потомства груши // Доклады РАСХН – 1998. – № 4. – С.15-16.