

633.34
Р62

О.А. РОЖАНСКАЯ

СОЯ И НУТ В СИБИРИ

КУЛЬТУРА ТКАНЕЙ,
СОМАКЛОНЫ, МУТАНТЫ



РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ

ГНУ СИБИРСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ КОРМОВ

О.А. РОЖАНСКАЯ

**СОЯ И НУТ В СИБИРИ:
КУЛЬТУРА ТКАНЕЙ, СОМАКЛОНЫ,
МУТАНТЫ**

НОВОСИБИРСК 2005

УДК 581.143.6

Рожанская О.А. Соя и нут в Сибири: культура тканей, соматклоны, мутанты. – Новосибирск: Юпитер, 2005. – 155 с.

ISBN 5-9657-0021-0

В монографии рассматриваются основные аспекты феномена соматклональной изменчивости растений. Изложены методики культивирования *in vitro* и регенерационные протоколы для отечественных сортов сои и нута, а также особенности полевых испытаний соматклонов и мутантов в условиях Сибири. Приведена подробная информация о количественной и качественной изменчивости потомств регенерантов и мутантов сои в семи поколениях, нута – в четырех. Обсуждаются возможности использования соматклональных вариаций в селекции.

Книга предназначена для специалистов по биотехнологии, генетике, селекции, физиологии и экологии растений.

Табл. 36. Ил. 23. Библиогр.: 374 назв.

Рецензенты:

д-р биол. наук *Л.А. Першина*,
канд. с.-х. наук *Р.И. Полюдина*

ISBN 5-9657-0021-0

© О.А. Рожанская, 2005
© СО РАСХН, 2005

ВВЕДЕНИЕ

Проблема дефицита протеинов в рационах людей и домашних животных привлекает особое внимание к производству растительного белка, важнейшим источником которого являются зерновые бобовые сельскохозяйственные культуры. Однако в условиях Сибири зернобобовые культуры не всегда и не везде надежно созревают, а их урожайность по годам нестабильна. В структуре посевных площадей Западной Сибири они занимают всего 1 – 2%, причем из всего разнообразия семейства бобовых возделываются в основном горох и яровая вика (Васякин, 1995; 2003). Расширение ассортимента и ареала возделывания зернобобовых в Сибири может произойти только за счет выведения и распространения новых адаптированных сортов.

В мировом растениеводстве основными зернобобовыми культурами являются соя (*Glycine max* (L.) Merr.) и нут (*Cicer arietinum* L.), отличающиеся высоким качеством зерна в сочетании с комплексом адаптивных свойств и технологических преимуществ, что и явилось причиной их широкого распространения на всех земледельческих континентах планеты. К сожалению, эти ценные культуры в большинстве районов Сибири не возделываются, хотя многолетние исследования В.Б. Енкена (1959), В.Е. Горина (1984), Н.И. Васякина (1985, 1995, 2002) показали реальную возможность стабильного производства зерна сои и нута в степной и лесостепной зонах Западной Сибири. Выдающимся достижением селекционеров явилось создание сортов сои сибирского экотипа, что граничит с коренным преобразованием этой культуры (Кашеваров и др., 2004).

Стратегия селекции на адаптивность для условий Сибири, сформулированная П.Л. Гончаровым (2002), предусматривает создание селекционного материала, приспособленного к экстремальным климатическим факторам, не снижающего резко продуктивность в стрессовых ситуациях, полнее использующего природные, технологические и организационно-экономические ресурсы. Актуальные направления селекции сои и нута – создание скороспелых, высокопродуктивных сортов, устойчивых к гидро-термическим стрессам и основным патогенам, с высоким качеством продукции. Соя и нут – самоопылители, сорта их высокоинбредны, поэтому для формирования генетической базы отбора целесообразно применять, наряду с традиционными методами гиб-

ридизации и мутагенеза, и эффективные биотехнологические методы, направленные на увеличение генетического разнообразия.

Новые признаки и комбинации признаков можно получать, используя соматическую изменчивость и мутагенез *in vitro* (Сидоров, 1990). Эти методы основаны на спонтанном или индуцированном возникновении в клетках разнообразных мутаций (так называемых соматических вариаций) при культивировании изолированных растительных тканей на питательной среде. Полученные из мутировавших клеток растения-регенеранты несут и передают своему потомству наследственные изменения самых разных признаков. Задачи исследователя состоят в получении и выявлении соматических вариаций, изучении их стабильности в ряду поколений и отборе перспективных форм для дальнейшей селекционной работы.

В книге, предлагаемой вниманию читателей, сделана попытка обобщения отечественного и зарубежного опыта и представлены результаты собственных исследований по проблеме соматической изменчивости на примере сои и нута.

Автор благодарит Е.А. Свежинцеву, Н.Г. Клеблееву, И.Б. Чернявскую, Л.Н. Чанышеву, Т.В. Шилову за участие в проведении лабораторных и полевых работ, В.И. Артемова за фотографии, Д.А. Потапова и С.В. Рожанскую за оформление рисунков. Я глубоко признательна академикам РАСХН П.Л. Гончарову и Н.И. Кашеварову, профессору Р.А. Цильке за оказанную методическую и практическую помощь.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

- B5** – питательная среда Гамборга B5 (Gamborg et al., 1968)
- In vitro** – "в стекле" (лат.): культивирование тканей, органов или организмов в пробирках или колбах
- M₁...M_n** – поколения линейных потомств растений-мутантов
- MS** – питательная среда Мурасиге-Скуга (Murashige, Skoog, 1962)
- R₀** – растения-регенеранты «нулевого поколения», полученные непосредственно *in vitro*
- R₁...R_n** – поколения линейных потомств растений-регенерантов
- γ-лучи** – гамма-лучи
- БАП** – 6-бензиламинопури́н (6-бензиладенин): регулятор роста, фитогормон (цитокинин)
- ИМК** – 3-индолилмасляная кислота: регулятор роста, фитогормон (ауксин)
- ИУК** – 3-индолилуксусная кислота (гетероауксин): природный регулятор роста, фитогормон
- Каллус** – масса дедифференцированных клеток
- Кинетин** – регулятор роста, фитогормон (цитокинин)
- Линия** – потомство одного растения, полученное путем самоопыления
- НУК** – 1-нафтилуксусная кислота: регулятор роста (ауксин)
- 1/2 B5** – питательная среда Гамборга B5 с уменьшенной вдвое концентрацией компонентов
- 1/2 MS** – питательная среда Мурасиге-Скуга с уменьшенной вдвое концентрацией компонентов
- 2,4,5-Т** – 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота: регулятор роста, фитогормон (ауксин)
- 2,4-Д** – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота: регулятор роста, фитогормон (ауксин)
- Соматональные вариации** – спонтанные мутации, возникающие в клетках *in vitro* и проявляющиеся у растений-регенерантов
- Соматоклоны** – растения-регенеранты и их потомства
- Соматический эмбриогенез** – формирование зародышей из соматических клеток
- Эксплант** – фрагмент живой растительной ткани, приготовленный для культивирования *in vitro*
- Эксплантирование** – выделение экспланта из растительного организма

Глава 1

МОРФОГЕНЕЗ IN VITRO И СОМАКЛОНАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ

Применение биотехнологии в растениеводстве и селекции

Начиная с 80-х годов прошлого века, селекционеры многих стран мира используют клеточные технологии для создания улучшенных форм растений (Brettell et al., 1980;1986; Edallo et al., 1981; Larkin, Scowcroft, 1981; Oono, 1981; Orton, 1984; Hildebrand et al., 1986; Росс, 1989; Dale et al., 1993; Атанасов, 1993; Fraley, 1994; Родина, 1995; Шумный, 2001).

В России были созданы сорта и новые уникальные формы риса, картофеля, сахарной свеклы, клевера, люцерны, люпина, томатов, гречихи, кукурузы, пшеницы, ячменя и многих других сельскохозяйственных культур с помощью биотехнологических методов (Кучеренко, 1986; Першина, Шумный, 1986; Хромова, 1987; Солодкая, Новоселова, 1987; Ильенко и др., 1989; Сидоров, 1990; Жук, 1993; Сатарова, 1993; Васильев, 1994; Голованова, Никитина, 1994; Яговенко, 1998; Барсукова, 2000; Россеев, 2001; Сорокатая, 2001; Зобова и др., 2002; Конышева, 2004; и др.). Методом соматоклональной изменчивости нами получен ценный селекционный материал рапса, эспарцета, сои, нута, люцерны (Рожанская, Свежинцева, 1991; Рожанская, Клеблеева, 1994а, б; 1999; Рожанская и др., 1999; 2002; Рожанская, 2002а,б; 2005).

Развитие современной биотехнологии культурных растений направлено на освоение молекулярно-генетических методов трансформации ДНК и переноса генов, практическое применение которых рассматривается как важнейший компонент селекции XXI века (Ковалёв, 2001; Цильке, 2002). Однако большинство количественных признаков сельскохозяйственных растений в генетическом плане пока не идентифицированы, а генноинженерные методики не разработаны. К тому же мы не в силах предусмотреть все последствия широкого использования трансгенных технологий, которые могут оказаться столь же опасными, сколь и выгодными, как считает А.А. Жученко (2003). Схема использования методов биотехнологии в растениеводстве и селекции представлена на рисунке 1.

Создание *in vitro* нового исходного материала для селекции растений (получение гаплоидов, соматоклональная изменчивость

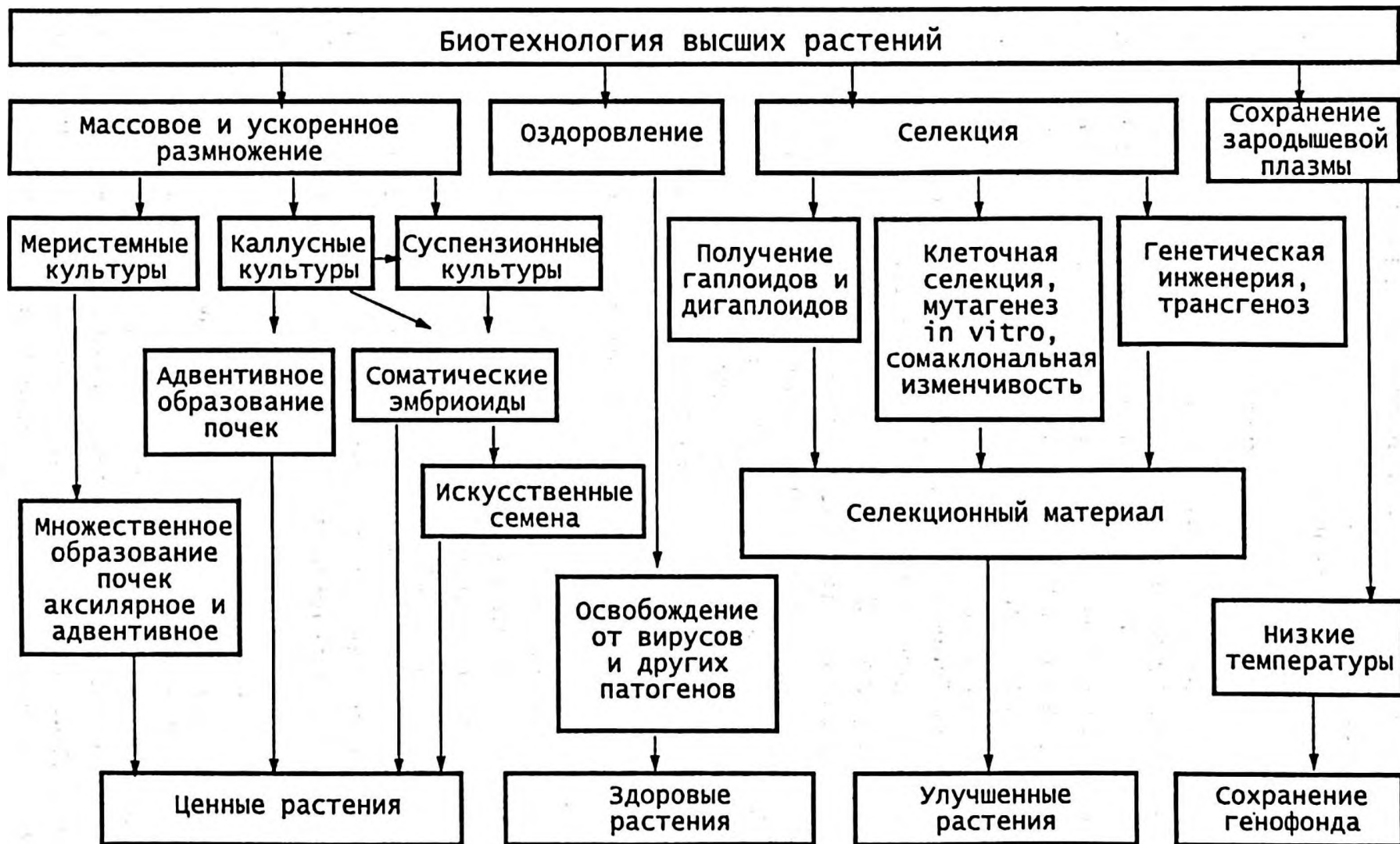


Рис. 1. Схема применения методов биотехнологии в растениеводстве и селекции

и мутагенез *in vitro*, клеточная селекция, соматическая гибридизация, генетическая инженерия и др.) предусматривает овладение способами управления морфогенезом.

Морфогенез в культуре растительных тканей

Ключевым моментом реализации биотехнологических методов является разработка регенерационных протоколов, т.е. методик получения целых растений из отдельных клеток или изолированных тканей. Регенерация растений из соматических тканей происходит благодаря свойству тотипотентности растительной клетки (Бутенко, 1964). Успех регенерационного процесса зависит от баланса фитогормонов, типа экспланта, длительности культивирования, минерального состава среды, физических условий культивирования, способности вида к регенерации и других факторов.

Морфогенез высшего растения как создание определенной материальной структуры является результатом влияния условий внешней среды на наследственно закрепленные признаки посредством сложных физиологических взаимодействий между органами, тканями, клетками, разделенными в пространстве и времени. В онтогенезе реализуются генетически закрепленные особенности и нормы морфогенетических реакций. Гармоничное осуществление процесса развития растения обеспечивается на уровне организма синтезом морфогенетически активных соединений в одних органах и тканях, переносом их на разные расстояния и рецепцией в тканях-мишенях, реагирующих соответствующим образом на эти стимулы (Бутенко, 1975; Шевелуха, 1992).

Начальное звено в цепи морфогенетических реакций целого организма – это его клетки, разнообразие которых являются результатом изменения темпа и направления их делений и роста. Цитодифференцировка представляет собой базу морфогенеза на клеточном уровне. Следовательно, анализ регулирующих механизмов размножения, роста и дифференцировки клеток может привести к пониманию механизмов морфогенеза целого растения.

Нормальным состоянием соматической клетки является митоз или подготовка к нему. Дифференцировка происходит после приостановки деления клеток посредством блокирования процессов подготовки к очередному митотическому циклу. Особенно важны

события детерминации, предшествующие морфогенетической реакции. Детерминированная система способна проходить определенный путь развития и достигать определенного состояния автоматически, даже если внешний стимул, побудивший ее развиваться в данном направлении, прекратил свое воздействие.

В культуре *in vitro* компетентная клетка, детерминированная к одному из трех типов морфогенеза, становится морфогенетической единицей каллуса, корня или побега (Моисеева, 1991). Начальным этапом морфогенеза *in vitro* следует считать превращение дифференцированной клетки экспланта в каллусную. Каллусообразование свойственно растительным тканям *in vivo* как естественная реакция организма на повреждение (Кренке, 1950). Формирование каллусной ткани связано с индукцией клеточного деления, способность к которому была блокирована в процессе дифференцировки тканей исходного растения до эксплантации. Возобновление митотической активности обусловлено дедифференцировкой растительной клетки и служит первым шагом к реализации тотипотентности, находящейся под генетическим контролем и связанной с функцией фитогормонов (Лутова, 1993). Эксплантированные ткани и клетки на искусственной питательной среде, содержащей минеральные соли, сахара и регуляторные вещества, переходят к неорганизованному размножению. Каллусную ткань в культуре *in vitro* легко образуют не только дедифференцированные, но и митотически активные меристематические клетки. Если дедифференцировка специализированной клетки связана с индукцией деления под влиянием фитогормонов, то дедифференцировка делящейся клетки меристемы связана с остановкой делений, деспециализацией и только после этого — с индукцией делений, приводящих к образованию каллуса.

Особенности каллусных клеток подробно рассмотрены в фундаментальных работах Р.Г. Бутенко (1964, 1975, 1985). Доказано, что длительно культивируемые клетки устойчиво сохраняют видовую, органную и тканевую специфику исходного экспланта. Они остаются способными к некоторым специфическим биосинтезам вторичного обмена и могут сохранять даже такие комплексные физиологические свойства исходного генотипа, как устойчивость к низким температурам или высокой концентрации сахарозы в среде. Тем не менее свободное существование вне организма определенным образом отражается на морфологических и функциональ-

ных характеристиках клеток, и каллусные культуры разного происхождения приобретают морфологическое сходство. Некоторые биохимические характеристики основного клеточного обмена каллусных клеток высших растений унифицируются, становясь более архаичными, приобретая сходство с обменом низших растений или даже бактерий.

Однако наиболее важным свойством культивируемой растительной клетки является тотипотентность – сохранение способности к вторичным дифференцировкам и образованию структур, свойственных только высшим растениям и тому исходному растению, генетическую информацию которого клетка сохраняет во время неорганизованного размножения.

Это уникальное свойство растительной клетки принципиально отличает ее от культивируемых клеток высших животных. В процессе морфогенеза возникают сформированные *de novo*, не связанные с предсуществующими инициалами элементы тканевых структур, корни, побеги, листья и цветки. Каллусная клетка может уподобиться зиготе и дать начало соматическому зародышу, вырастающему затем в целое растение, способное цвести и плодоносить.

С.Э. Смоленская (2002) следующим образом систематизировала реакции, наблюдаемые при культивировании *in vitro*:

Способ получения	Тип реакции
Прямой (из клеток или тканей экспланта)	Ризогенез Органогенез Соматический эмбриогенез Каллусогенез (образование неморфогенного каллуса)
Непрямой:	
1) из первичного каллуса	Ризогенез Органогенез Соматический эмбриогенез
2) из пассируемого каллуса	Органогенез Соматический эмбриогенез
3) вторичный из каллуса на побегах или соматических эмбрионах	Соматический эмбриогенез Органогенез

Способность к регенерации дана от природы всем живым организмам для заживления ран, восстановления или компенсации утраченных частей. Термин «регенерация» обозначает, с одной стороны, восстановление целостности организма, с другой – обра-

зование новых организмов из соматических клеток. Изучая регенерационные процессы у животных, М.А. Воронцова впервые определила регенерацию как вторичное развитие: «регенерация есть процесс вторичного развития органов или тканей, вызванный повреждением того или иного рода» (Воронцова, 1949, с. 33). Первичным развитием считается онтогенез, т.е. развитие организма от яйца до взрослого состояния. По мнению Б.П. Токина, у животных нельзя смешивать соматический эмбриогенез с регенерацией, поскольку различия между ними чрезвычайно велики: в первом случае происходит закладка и развитие нового организма, не совпадающего с материнским, во втором – производится починка старого. В ходе эволюции животного мира способность к соматическому эмбриогенезу, как и к бесполому размножению, ослабляется, к регенерации – усиливается (Токин, 1959).

У растений в ходе эволюции сохранились различные формы вегетативного и бесполого размножения, что сглаживает различия между процессами первичного и вторичного развития растительных организмов. Несмотря на известные морфологические особенности соматического эмбриогенеза и органогенеза (рост эмбриоида носит биполярный характер, побега – униполярный), в итоге мы получаем равноценные растения-регенеранты, которые могут быть идентичны исходному генотипу, а могут и отличаться от него.

Согласно Ф.М. Куперман (1977), в культуре тканей *in vitro* растение проходит две фазы органогенеза:

- возникновение меристемы в каллусе и появление почек или эмбриоидов, что соответствует I и II_a этапам органогенеза;
- активный рост зачаточных органов и формирование побега, соответствующие II_b этапу органогенеза.

Способность к регенерации генетически детерминирована. Процессы каллусо-, корне- и побегообразования контролируются разными группами генов (Лутова, 1993; Лутова и др., 1994). Установлено, что на регенерационную способность влияют ядерные и цитоплазматические гены, не являющиеся специализированными генами культуры тканей (Henry et al., 1994).

Началом процесса регенерации побега или соматического зародыша на клеточном уровне является изменение типа деления в отдельной клетке или небольшой группе клеток. Деления в такой клетке быстро следуют одно за другим без перехода к росту рас-

тяжением. В результате возникает очаг мелких клеток меристематического типа, отличающихся от вакуолизированных каллусных клеток увеличенным ядерно-плазменным отношением. Процессы органогенеза и эмбриогенеза в каллусе асинхронны: наряду с полностью сформированными регенерантами в клеточной популяции могут присутствовать клетки, только приступающие к образованию очага меристемы. Каллусная клетка, превращаясь в меристематическую, реорганизует свою внутреннюю структуру: возрастает число рибосом, митохондрий, меняется внутренняя структура последних, в пластидах накапливается крахмал. Инициальные клетки эмбрионов и меристематических очагов отличаются от каллусных клеток интенсивным синтезом ДНК, РНК и белка (Данилина, 1974). Микроскопические исследования позволили выявить активизацию межклеточных взаимодействий и внутриклеточных процессов в проэмбрионных структурах и очагах органогенеза. Если каллусная клетка во многих отношениях существует сама по себе, то в клетках организующихся структур повышается число плазмодесм, связывающих их между собой, и микротрубочек, которые считаются ответственными за внутриклеточный транспорт. Установлено, что начало дифференцировки тканей соматического зародыша связано с правильной ориентацией микротрубочек вдоль внешней мембраны (Бутенко, 1975).

В работах Н.Ф. Кузнецовой (1998, 2003) по изучению репродуктивного цикла сосны *Pinus sylvestris* L. приводятся убедительные доказательства существования у растений не только «наследственной линии» по формированию генома будущего организма, но и «энергетической линии» по концентрации биологической энергии у инициали зародыша до максимального для вида уровня путем активирующих делений – разновидности асимметричного митоза. Деления активации происходят так, что одна из дочерних клеток повышает свой энергетический потенциал за счет другой, которая погибает, утратив энергию. Можно предполагать, что и в культуре *in vitro* при формировании инициали соматического зародыша или побега первые деления должны носить активационный характер, обеспечивая накопление биологической энергии для ойттогенеза растения-регенеранта. В таком случае рост регенерационного потенциала ткани будет сопровождаться гибелью некоторых клеток. Подтверждением этой гипотезы может служить прямая корреляция между частотой эмбриогенеза и долей клеток с

признаками апоптоза, обнаруженная в суспензионной культуре моркови (Pennel et al., 1992) и каллусных тканях пшеницы и ячменя (Bishimbayeva, 2002).

Роль фитогормонов в регуляции морфогенеза

Клеточная дифференциация и развитие растений контролируются балансом и уровнями растительных гормонов. Присутствие экзогенных гормональных факторов считается обязательным условием дедифференцировки клетки и превращения ее в каллусную. В качестве модельной биотехнологической системы во многих лабораториях применяют изолированную сердцевинную паренхиму стебля табака (СПТ), в экспериментах с которой был открыт один из основных классов фитогормонов – цитокинины (Skoog, Miller, 1957). Согласно теории гормональной регуляции Скуга и Миллера, тип морфогенеза определяется соотношением концентраций ауксина и цитокинина в среде.

Фитогормоны представляют собой низкомолекулярные соединения. Основным природным ауксином является индолил-3-уксусная кислота (ИУК), производное триптофана. Ауксины стимулируют рост растяжением, могут активировать и тормозить процесс деления клеток, индуцируют образование корней, ускоряют синтез пектина в клеточной стенке, усиливают поглощение клеткой воды и растворенных в ней веществ. Природные цитокинины синтезируются в корнях и представляют собой аденин-6-замещенные аминопурины; наиболее активный из них – зеатин. Цитокинины стимулируют процессы деления клеток, активизируют синтез РНК и белка, подавляют апикальное доминирование, ускоряют цветение, вызывают зеленение листьев и задерживают их старение, а в избыточном количестве содействуют дефолиации. Было установлено, что определенное превышение содержания ауксина над кинетином в среде вызывает развитие корней, обратное соотношение концентраций этих фитогормонов приводит к формированию почек и стеблевых побегов. Дополнительное введение в питательную среду аминокислот тирозина и фенилаланина, а также фосфатов, способствует усилению эффекта цитокининов и соответственно уменьшает эффект ауксинов. Введение гибберелловой кислоты тормозит процессы стеблевого и корневого морфогенеза, а абсцизовая кислота снижает эффект гиббереллина (Skoog, Miller, 1957; Туркова, 1967; Thorpe, 1978; Кулаева, 1985;

Зубкова и др., 1990). В наших опытах по культивированию *in vitro* тканей рапса (Рожанская, Козиенко, 1989) и в экспериментах Н.А. Моисеевой на тканях СПТ (1991) гиббереллин не влиял на конечный морфогенетический эффект, но вызывал изменения морфологии адвентивных побегов.

Н.Н. Дмитриева в опытах на клетках СПТ выявила триггерную роль кинетина при переходе клетки к делению либо к росту растяжением. На среде с одним ауксином клетки, подготовленные к делению прошедшими синтезами РНК и ДНК, но заблокированные отсутствием кинетина в премитотическом периоде цикла, в митоз не вступали и переходили к растяжению (Дмитриева, Бутенко, 1970; Дмитриева, Липский, 1973).

Соматический эмбриогенез в первые моменты индукции и детерминации требует присутствия гормонов, дальнейшее же развитие зародыша является процессом независимым от гормональных факторов. Развивающийся зародыш сам делается источником необходимых для его развития гормонов. Становление многоклеточного организма связано с приобретением способности к саморегуляции (Бутенко, 1975).

При заражении *Agrobacterium tumefaciens* и *A. rhizogenes* в геном растений встраиваются онкогены Т-ДНК, детерминирующие синтез фитогормонов. В опухолевых клетках синтезируются собственные эндогенные ауксины и цитокинины, обеспечивающие автономный рост опухоли типа корончатого галла или бородачатых корней (Пирузян, 1988).

Исследования Л.А. Лутовой (1993) показали, что процессы дедифференцировки и вторичной дифференцировки (корне- и побегообразования) наблюдаются не только у изолированных тканей *in vitro*, но и при трансформации агробактериями. Линии и сорта с высокой регенерационной способностью обладали высокой способностью к трансформации. По мнению автора, это говорит об определяющей роли генотипа, т.е. генетически детерминированного эндогенного баланса фитогормонов, в сравнении с экзогенным регулированием морфогенетического ответа на экспериментальное воздействие.

Л.А. Кучеренко, не отрицая значительной роли генотипа, на практике считает возможным создание адекватных условий для массовой регенерации *in vitro* растений любого вида и сорта. Она справедливо полагает, что если сорт не дает регенерантов на не-

скольких модификациях питательных сред, это не значит, что неспособность к регенерации у данного сорта генетически детерминирована, но свидетельствует лишь о том, что каллус данного сорта не способен к регенерации в конкретных экспериментальных условиях (Кучеренко, 1991)

Нарушение гормонального баланса культивируемых клеток считается одной из основных причин возникновения генетического разнообразия *in vitro* (соматональной изменчивости), поскольку может приводить к изменениям кинетики клеточного цикла. В результате нарушений цитокинеза появляются клетки с отличным от исходного геномом. От соотношения фитогормонов, которые регулируют клеточный и тканевой гомеостаз, во многом зависит и цитогенетическая структура клеточных популяций (Кунах, 1980). Культивирование клеток на искусственных питательных средах, содержащих экзогенные фитогормоны, обычно нарушает гормональный баланс, вследствие чего возникает морфологическая и цитогенетическая разнокачественность клеточных популяций (Shamina, 1966; Фролова, Шамина, 1974).

Генетическая изменчивость *in vitro*

С первых работ по культивированию растений *in vitro* внимание исследователей привлекало цитологическое изучение клеток, растущих вне организма. Было установлено, что процесс культивирования клеток и тканей на искусственных питательных средах может сопровождаться различными аномалиями митоза, приводящими к возникновению значительного генетического разнообразия в популяциях клеток (Buvat, 1944; Naylor et al., 1954; Mitra et al., 1960; Murashige, Nakano, 1966; Shamina, 1966). Среди растений, возникающих из недифференцированной каллусной ткани и в культуре изолированных протопластов, обнаружили формы с иным числом хромосом, генетическими и соответственно фенотипическими изменениями по сравнению с исходным растением (Бутенко и др., 1967; Sacristan, Melchers, 1969; Takebe et al., 1971; Binding et al., 1978; Shepard et al., 1980; Thomas et al., 1982; Lörz, Scowcroft, 1983). В культуре клеток *in vitro* происходит автоселекция наиболее приспособленных к условиям выращивания клеточных типов (Бутенко, 1975). В длительно пассируемой культуре клеток отбор идет в соответствии с коэффициентом их размножения и не контролируется морфогенезом; изменение условий выра-

щивания обычно меняет направление отбора. Вариабельность растений, прошедших стадию неорганизованного роста, в той или иной степени отражает генетическую изменчивость клеток в культуре *in vitro* (Сидоров, 1990).

Информация, накопленная в разных лабораториях, подтвердила, что прохождение клетками стадии неорганизованного роста *in vitro* способствует возникновению новых форм растений, отличающихся от исходных. По данным В.А. Высоцкого (1995), клональное микроразмножение обеспечивает генетическую стабильность только при использовании меристем, детерминированных к развитию побегов, в условиях, ингибирующих каллусообразование, т. е. на средах без ауксинов. Использование различных фитогормонов на разных стадиях микроэволюции клеточных популяций (для индукции каллусогенеза, пролиферации каллуса или пассивирования сформированной ткани) по-разному влияет на цитогенетические особенности культивируемых клеток. Различные типы морфогенеза (соматический эмбриогенез или органогенез), регулируемые главным образом разным содержанием и соотношением экзогенных фитогормонов, могут по-разному сказываться на генетических изменениях и, соответственно, на фенотипе растений-регенерантов. Генетическую изменчивость клеток, культивируемых *in vitro*, могут вызвать и другие компоненты питательной среды: отдельные минеральные элементы, углеводы, витамины, токсины, органические добавки и пр., а также режим культивирования (Deambrogio, Dale, 1980; Reisch, 1983; Daub, 1984; Barg, Umiel, 1985; Hitomi et al. 1998; Plader et al.; 1998).

Стабильные (сохраняющиеся после прекращения действия индуцирующего фактора) и наследуемые изменения у растений, регенерированных из соматических клеток *in vitro*, называют соматическими вариациями.

В 80-х годах прошлого века изучение этого феномена вошло в практику многих исследователей, а термин «соматическая вариабельность», обозначающий разнообразие среди клеточных линий и растений-регенерантов, стал общепринятым. Причины возникновения соматической изменчивости сопряжены с фундаментальными проблемами развития, дифференцировки и регуляторной активности генов, но для практического использования достаточно установить наследуемость вариаций и управлять их размахом. Если целью служит получение однородного материала,

сомаклональную вариабельность желательнo свести к минимуму, тогда как для получения дополнительной генетической изменчивости степень вариабельности необходимо усилить.

Действенным способом сохранения генетического постоянства у растений-регенерантов является сокращение периода прохождения неорганизованного роста *in vitro*. Для сохранения генетической стабильности в суспензионных культурах, как правило, используют регулярное пассирование, а также специально спланированные питательные среды (Evans, Gamborg, 1982). Подобный эффект, а также генетическую стабилизацию клеточных популяций, могут вызывать синтетические вещества цитокининового действия (Frolova et al., 1984).

Механизмы индуцируемого *in vitro* разнообразия, характер изменчивости, возможности регуляции и использования данного явления для практической селекции сельскохозяйственных растений рассматривались многими зарубежными и отечественными исследователями. Необходимость генетического анализа потомств растений, полученных *in vitro*, привела к созданию специальной терминологии и символики. Первоначально предлагалось называть растения-регенеранты из каллусной ткани «калликлонами» (Skirvin, Janik, 1976a), а из протопластов – «протоклонами» (Shepard et al., 1980). Термин «сомаклоны» предложили австралийские ученые P.J. Larkin и W.R. Scowcroft (1981) для растений, прошедших стадию неорганизованного роста *in vitro*. R. S. Chaleff (1981) для регенеранта предложил символ R, для потомка первичного регенеранта после самоопыления – R₁, а для последующих поколений – R₂, R₃ и т.д. Другие исследователи (Edallo et al., 1981; Sears, Deckard, 1982; Evans, Sharp, 1983) обозначили регенерант «нулевого» поколения R₀; M. Sibi (1976) те же поколения обозначал P₀, P₁ и т. д. Эти числовые индексы не соответствуют общепринятой генетической символике, поэтому другие авторы изменили нумерацию так, что R₁ соответствовал первичному регенеранту, а R₂, R₃ и т.д. – последующим поколениям. П. Ларкин с соавторами (Larkin et al., 1984) для создания единой номенклатуры предложили аббревиатуру SC (сомаклон), используя обозначение SC₁ для регенеранта, а SC₂, SC₃ и т. д. – для последующих поколений. Все же большинство исследователей предпочли обозначения R₀, R₁, R₂..., которые применяются с небольшими модификациями независимо от происхождения куль-

тивируемых клеток, дающих растения-регенеранты. Мы также придерживаемся этой номенклатуры.

Генетические исследования потомств соматклонов стали проводить сразу же после открытия феномена соматклональной изменчивости. Результаты исследований на пшенице (Larkin et al., 1983), томатах (Evans, Sharp, 1983), рисе (Ono, 1985) убедительно доказали, что большая часть соматклональных вариаций обусловлена стабильными генетическими изменениями, т. е. мутациями. Фенотипические и генетические изменения, возникшие после прохождения растениями стадии культуры клеток, были выявлены при изучении регенерантов из протопластов мутанта табака *aurea* с промежуточным типом доминирования. Характер расщепления существенно отличался от ожидаемого менделевского 1 : 2 : 1 (Lörz, Scowcroft, 1983).

Наследование вариаций моногенных и полигенных признаков было изучено на пшенице (Scowcroft, Ryan, 1986). Среди соматклонов обнаружены изменения по морфологическим и биохимическим признакам, находящимся под простым (состав глиадинов, цвет зерна) и полигенным генетическим контролем (высота растений, сроки колошения, урожайность). Отдельные соматклоны сочетали вариации по признакам, которые в потомстве группируются независимо. Среди первичных регенерантов выявлены как гетерозиготные, так и гомозиготные мутанты, причем отдельные соматклоны имели оба состояния в разных локусах. Мутации затрагивали признаки, по которым основные генные локусы локализованы во всех семи гомеологических группах, среди них были рецессивные (остистость, цвет зерна), доминантные (цвет шелухи зерна, безостость) или кодоминантные (глиадины).

Проведен генетический анализ соматклонов томатов *Lycopersicon esculentum* (Evans, Sharp, 1983; Evans, 1984; Miller et al., 1985). Среди 230 регенерантов обнаружено 13 форм с дискретными ядерными мутациями, в том числе с доминантными, контролирующими созревание плодов и габитус, и одиночными рецессивными: бесколенчатости плодоножки, оранжевой мякоти плода, пигментдефектности, крапчатости листьев. Наследование признаков изучалось в потомствах R_1 и R_2 , а также в потомстве от скрещивания растений R_1 с известными мутантными линиями. В поколении R_1 получены пестролистные хлорофиллдефектные мутанты, идентифицированные как цитоплазматические; полудоминантная

мутация, контролирующая вариант алкогольдегидрогеназы; доминантная мутация устойчивости к *Fusarium oxysporum* расы 2. Определенная на основании этих исследований частота одиночных генных мутаций составила 4 – 5%. Благодаря соматклональной изменчивости удалось получить новые генные мутации, не обнаруженные при обычном мутагенезе. Получены доказательства, что причиной вариаций может быть митотическая рекомбинация и мутации хлоропластной ДНК.

Подтверждения генетической природы соматклонального варьирования получены при использовании в качестве генетических маркеров электрофоретических спектров запасных белков семян: глиадинов пшеницы, гордеинов ячменя, белков люцерны (Larkin et al., 1984; Brettell et al., 1986; Cooper et al., 1986; Metakovsky et al., 1986; Атанасов, 1993; Дейнеко и др., 1997; Зобова, 2002). Молекулярно-генетические методы анализа ДНК дают интересную информацию о различных изменениях ядерных и мт-генов и микросателлитных ДНК-маркеров в культуре *in vitro* (Kanasava, 1998; Melnyk et al, 2002; Sivolap, 2002; Gesteira et al., 2002).

Механизмы соматклональной изменчивости

Цитологические и молекулярно-генетические исследования свидетельствуют, что варибельность, индуцируемая условиями культивирования *in vitro*, связана с истинно генетическими изменениями. R.J. Larkin и W.R. Skowcroft (1981, 1983a), F. D'Amato (1985); M. Lee и R.L. Phillips (1988); M. Buiatti (1989), A. Carp (1995) выделили следующие возможные механизмы генетической изменчивости *in vitro*:

1. грубые кариологические изменения, происходящие в результате ядерной фрагментации и/или дисфункции митотического веретена;

2. криптические хромосомные перестройки и изменения в экстрахромосомном геноме, как результат:

- активации мобильных генетических элементов;
- поздней репликации гетерохроматина;
- амплификации и редукции генов;
- соматического кроссинговера и обмена сестринских хроматид;
- нуклеотидной несбалансированности;
- криптической элиминации вирусов;
- ослабления или повреждения механизмов репарации.

Наиболее крупные нарушения, такие как анеуплоидия и серьезные хромосомные aberrации, элиминируются в процессе регенерации или прохождения через мейотический фильтр (D' Amato, 1985; Buiatti, 1989). Селективное преимущество, как наиболее жизнеспособные, получают регенеранты с тем же числом хромосом, что и у исходных растений (Першина, Шумный, 1986). Как грубые, так и тонкие хромосомные изменения – мелкие делеции, дубликации, транслокации, инверсии – могут вызывать существенные фенотипические изменения не только в первичных регенерантах, но и в их потомстве. Интенсивные перестройки хромосом часто наблюдаются при исследовании мейоза регенерантов: транслокации, инверсии, субхроматидные обмены, частичная утрата хромосом (Orton, 1980; Ogihara, 1981; McCoy et al., 1982; Li, Dong, 1994). Это доказывает, что большая часть фенотипических изменений генетически обусловлена.

В результате цитологических и цитофотометрических исследований в культуре гомоплоидных протопластов показано, что эндоредупликация, поли- и анеуплоидия наблюдаются уже на начальных этапах культивирования. Обнаруженные изменения содержания ДНК в клетках связаны прежде всего с аномалиями цитокинеза, которые отмечались уже при первом клеточном делении (Сидоров и др., 1977; Глеба и др., 1978; Sree Ramulu et al., 1984). Имеются данные о триггерном влиянии культуры ткани на транспозиционные эффекты (Lörz, Scowcroft, 1983; Lörz, Brown, 1986). Доказан вклад в соматическую изменчивость амплификации или редукции генов, индуцированных на стадии культивирования клеток *in vitro* (Donn et al., 1984). На молекулярном уровне выявлены тонкие перестройки ядерной ДНК у протоклонов и соматоклонов (Landsmann, Uhrig, 1985; Brettell et al., 1986; Kanasava, 1998; Melnyk et al, 2002).

А. Binns и F.J. Meins (1973) выделяли эпигенетические изменения фенотипа, которые могут стабильно передаваться дочерним клеткам, но не проявляться в регенерантах или их половом потомстве. Часть соматических вариантов объясняется изменением характера метилирования ДНК у культивируемых *in vitro* клеток, где наблюдается как локус-специфичность, так и сайт-специфичность этого явления (Хвырлева и др., 1986). Изменения уровня метилирования ДНК были обнаружены у 25% растений-регенерантов R₂ кукурузы (Lörz, Brown, 1986).

В процессе прохождения растениями *in vitro* стадии неорганизованного роста могут происходить изменения цитоплазматических генетических элементов и проявляться в вариациях признаков, наследуемых по материнской линии. Перестройки мтДНК впервые обнаружили среди соматклонов кукурузы, полученных из каллусной ткани в культуре незрелых зародышей (Kemble et al., 1982). Известно, что растения кукурузы, несущие цитоплазму Т-типа (Техасская), являются мужскостерильными и высокочувствительными к *Helminthosporium maydis* расы Т и токсину этого гриба. Среди растений кукурузы, полученных из каллусной ткани с Т-цитоплазмой, обнаружены мужскофертильные токсинустойчивые растения. Данный признак наследовался по материнской линии. Подобные изменения мтДНК, наблюдаемые при культивировании *in vitro*, никогда не обнаруживали во время обычного размножения кукурузы семенами (Gengenbach et al., 1977; Brettell et al., 1979, 1980). Перестройки мтДНК также обнаружены в популяции протоклонов картофеля: у 5 протоклонов из 47 отмечены изменения в последовательностях высокомолекулярной мтДНК, два растения имели дополнительные низкомолекулярные формы мтДНК (Kemble, Shepard, 1984). Изменения в составе митохондриальной ДНК табака в ходе длительного культивирования и регенерации А. Kanasawa (1998) объяснил рекомбинациями *de novo* и селективной амплификацией молекул мтДНК.

Имеется много сведений о соматклональных вариациях пластидного генома. Цитоплазматическая природа хлорофилльных мутаций у соматклонов показана в работах Zong-Xui с коллегами (1983) и Evans (1984). Довольно часто возникают альбиносные регенеранты, особенно в культуре пыльников злаков (Deambrogio, Dale, 1980; Oono, 1981; Sree Ramulu et al., 1984a; Гапоненко и др., 1985a; Гостимский и др., 1985; Васильев, 1996). Установлено, что андрогенные альбиносы характеризуются делециями пластидной ДНК, которые могут достигать 40-80% генома хлДНК (Day, Ellis, 1984; Annil, Noel, 1985; Ананьев и др., 1986).

Причины соматклональной изменчивости

Из вышеизложенного следует, что спектр регистрируемых соматклональных вариаций очень широк и включает морфологические, физиологические и биохимические признаки. Изменения происходят как в ядерной, так и в цитоплазматической ДНК, опи-

саны растения-регенеранты с крупными геномными перестройками и точковыми мутациями. Некоторые изменения физиологического происхождения (морфозы) проявляются лишь у растений, непосредственно полученных из культивируемых клеток, но не наследуются. Однако значительная доля изменений имеет мутационную природу, причем частота образования вариантов намного превышает частоту спонтанного мутагенеза и сильно зависит от исходного генотипа и экспланта.

В чем же источник соматклональной изменчивости? По мнению большинства исследователей (Larkin, Scowcroft, 1981; Karp, Bright, 1985; Demarly, 1986; Lee, Phillips, 1988; Buiatti, 1989; Сидоров, 1990; Витанова и др., 1990; Долгих, Шамина, 1991; Атанасов, 1993; Karp, 1995), основными причинами соматклональных вариаций являются:

1. генетическая гетерогенность соматических клеток исходного экспланта;
2. генетическая изменчивость, индуцируемая условиями культивирования *in vitro*.

Действительно, на различных этапах онтогенеза в ходе дифференцировки почти у 80% покрытосеменных может происходить эндоредупликация хромосом и формирование тканей различного уровня пloidности, хотя дифференцированные клетки тканей растений находятся главным образом в эупloidном состоянии, (D'Amato, 1978; Кунах, 1978, 1980). В соматических тканях растений нередко присутствуют клетки с измененным анеупloidным числом хромосом, особенно у апомиктичных и вегетативно размножаемых растений (Бреславец, 1963). Например, у картофеля происходит активное накопление вегетативных мутаций, поэтому сорта со временем теряют свои свойства (Ассеева, 1968). С другой стороны, повышенная частота наследственных изменений в соматических тканях отмечалась у гетерозиготных генотипов, в частности у аллогамных видов люпина (Атабекова, 1960). Причиной высокой гетерогенности соматических тканей у растений с бесполом размножением служит отсутствие в жизненном цикле мейоза как эффективного фильтра хромосомных aberrаций, а у гетерозиготных растений – нестабильность генома, совмещающего различные аллели. По-видимому, наименьшую частоту вегетативных мутаций в соматических тканях имеют растения-самоопылители.

Явление «почечных вариаций» (bud variation) описано Ч. Дарвином как источник новых признаков, позволивший из обычного персика с опушенными плодами получить нектарин («голый персик») с улучшенным вкусом (Дарвин, 1896). Таким образом, индуцируя *in vivo* или *in vitro* образование адвентивных побегов, можно получить новые формы растений (Skene, Barlass, 1983; D'Amato, 1984). Активизация хромосомных перестроек, приводящих к появлению химерности и миксоплоидии у растений, наблюдается при изменении условий произрастания: понижении и повышении температуры, засолении, внесении высоких доз минеральных удобрений, ранении, переносе растений в непривычные условия обитания, опылении чужеродной пылью. Результатом действия этих и других внешних факторов являются аномальные митозы и клетки с числом хромосом, отличным от такового в материнской ткани (Кунах, 1980). Итак, многоклеточный генетически неоднородный эксплант при культивировании *in vitro* может сформировать гетерогенную популяцию, из которой в свою очередь будут получены растения, отличающиеся от исходного. Поэтому доля измененных регенерантов у вегетативно размножаемых культур – сахарного тростника и картофеля – обычно выше, чем у растений с половым размножением, и достигает 70% (Karp, Bright, 1985).

Тем не менее генетическая неоднородность исходного экспланта не является необходимым условием появления соматоклональной изменчивости. Накопленный в разных лабораториях экспериментальный материал показывает, что большая часть соматоклональных вариаций возникает именно во время культивирования клеток *in vitro* (Сидоров, 1990). По данным Е.Д. Никитиной (2001), 83% регенерантов пшеницы *Triticum aestivum* L. существенно отличались от исходного сорта Скала по одному или нескольким признакам. Таким образом, частота соматоклональных вариаций у самоопыляющегося вида с предположительно небольшой вегетативной изменчивостью может быть более высокой, чем у вегетативно размножаемых сахарного тростника и картофеля с гетерогенными эксплантами.

Об индуцирующем влиянии культивирования *in vitro* свидетельствует хорошо известная прямая зависимость частоты появления измененных регенерантов от продолжительности культивирования (McCoy et al., 1982; Витанова и др., 1990; Karp, 1995; Plader et al., 1998), хотя аномалии цитокинеза отмечались уже при первом

клеточном делении (Сидоров и др., 1977; Sree Ramulu et al., 1984). Даже при гарантированном генетическом единообразии исходного материала, т. е. при использовании в качестве экспланта одиночной клетки или протопласта, соматональные вариации неизменно возникали в процессе культивирования (Karp, Bright, 1985), а среди дигаплоидных растений, полученных в культуре пыльников, обнаружены гетерозиготные мутанты (D'Amato, 1985).

И все же само по себе культивирование *in vitro* является необходимым, но не достаточным условием получения соматональных вариантов. При микроклональном размножении побеги регенерируют непосредственно из меристемы, минуя стадию каллуса, при этом, как правило, все растения идентичны родительским (Orton, 1984; Lourens, Martin, 1987; Высоцкий, 1995). Появление дополнительной изменчивости определяется наличием *этапа дедифференцированного роста* растительной ткани. Доказано, что соматональные вариации возникают как следствие нарушения порядка в клеточных процессах, обслуживающих деление и сопутствующих ему. Заметное возрастание генетических aberrаций происходит при быстрых клеточных делениях и при недостатке онтогенетического принуждения (*ontogenetic constraints*), свойственном неорганизованной ткани (Gould, 1986). Регенеранты из недифференцированного каллуса кукурузы имели больше вариаций признаков, чем растения, полученные из меристематических клеток или путем прямого соматического эмбриогенеза (Armstrong, Phillips, 1988). Мы исследовали 4 поколения потомств регенерантов из тканей одного растения рапса. Количественные признаки в группе соматоклонов из каллуса варьировали в 2 – 3 раза сильнее, чем в группе клонов из стеблевых узлов (Рожанская и др., 1999).

Т. Ортон, объясняя резкое возрастание вариабельности у регенерантов из протопластов по сравнению с регенерантами из меристем, зародышей, почек *in vitro*, выдвинул гипотезу о низком уровне ошибок у активно делящихся клеток (Orton, 1984). По мнению Р.Г. Бутенко (1986), причиной нестабильности генотипов культивируемых клеток является активация гена-мутатора. Ю.М. Константинов и М.И. Ривкин (1991) предложили свободнорадикальный механизм возникновения соматональной изменчивости в процессе перекисного окисления липидов, индуцируемого прооксидантами в составе питательных сред.

Согласно гипотезе Y. Demarly (1986), клетка испытывает воздействие регулирующих сигналов (гормональных, трофических, физических) со стороны организма и соседних клеток и сама производит регуляторные сигналы. При изменении внешних условий поступает новая информация, она влияет на экспрессию тех или иных генов и тем самым изменяет сигналы, идущие из клетки. После введения в культуру *in vitro* изменяется спектр работающих генов, а если клетка не может приспособиться к новым условиям, то в ней возникают нарушения и мутации. Одни, наиболее крупные изменения, элиминируются в процессе регенерации, другие сохраняются и наследуются при семенном размножении.

Представляется очевидным, что фундаментальные причины соматической изменчивости кроются в процессах, происходящих на субклеточном уровне при переходе клетки к дедифференцировке либо ко вторичной дифференцировке *in vitro*.

Современное представление о растении как интегрированной системе генетических детерминантов ядра и цитоплазмы подразумевает существование каскада генетических систем, защищающих целостность генома вида (Жученко, 2003). Такие системы контроля обеспечивают генетическую идентичность организма. Исходя из анализа научных публикаций и результатов наших исследований, можно полагать, что «блок управления» системы контроля возникает перед началом дифференцировки зародыша и обеспечивает детерминацию клеток. Иными словами, прежде всего будущий организм получает план своего построения, т.е. то, что Н.П. Дубинин (1986, с. 442) называл «*общим планом развития*».

Оставляя открытым вопрос о физической природе *плана развития*, предположим, что он осуществляет первичное программирование развития зародыша и регуляцию активности генов. Дальнейшие процессы дифференцировки тканей, развития и функционирования органов проходят под системным контролем с использованием прямых и обратных связей; «сверяясь с планом», организм исправляет генетические нарушения с помощью систем репарации или элиминации дефектных структур. Функционирование системы контроля начинается с первых шагов онтогенеза. Например, если генеративные клетки кукурузы, по данным Н.В. Кривова с коллегами (1993), детерминируются на стадии 4-клеточного эмбриона, то *план развития* должен возникнуть не позднее второго деления зиготы. Контролируя каждый момент онтогенеза, индиви-

дуум сохраняет свою идентичность в процессе развития, тем самым обеспечивая наследственность, сохранение генетической стабильности и видовой специфичности.

Рассмотрим ситуацию в культуре растительных тканей *in vitro*. Технологии предусматривают использование изолированных частей растений, и в процессе эксплантирования прерывается связь с организмом и перестает работать система контроля. Если эксплант содержит меристему, детерминированную к дифференцировке, имеющийся у нее *план развития* способен активировать собственные системы контроля и не допустить генетических нарушений в тканях развивающегося побега. Поэтому микрклональное размножение растений в условиях, исключающих каллусообразование, обеспечивает генетическую идентичность потомков.

Иначе обстоит дело с немеристемными эксплантами. В условиях *in vitro*, при наличии всех необходимых элементов жизнеобеспечения и соответствующего гормонального управления, клетки дедифференцируются и начинают пролиферировать бесконтрольно, формируя неорганизованную массу ткани. Бесконтрольный цитокинез сопровождается генетическими нарушениями, которые не корректируются из-за бездействия или отсутствия систем контроля и репарации.

Как же в неорганизованной ткани происходит соматический эмбриогенез или образование адвентивных побегов? По-видимому, в процессе регенерации каждая компетентная клетка на базе собственного генома формирует *de novo* индивидуальный *план развития* будущего растения. Обособленность и индивидуальный характер события косвенно подтверждается известной разобщенностью и асинхронностью процессов морфогенеза в неорганизованной ткани. Возникновение *плана развития* происходит во время первых делений проэмбриоида или очага меристемы, совпадая с периодом энергетической активации инициали регенеранта. Вновь созданный системный контроль фиксирует накопленные исходной клеткой генетические изменения как присущие новому растению.

Так генетические нарушения, полученные в ходе неорганизованной пролиферации, реализуются в растениях-регенерантах и передаются их потомкам в виде соматических вариаций качественных и количественных признаков (рис. 2).

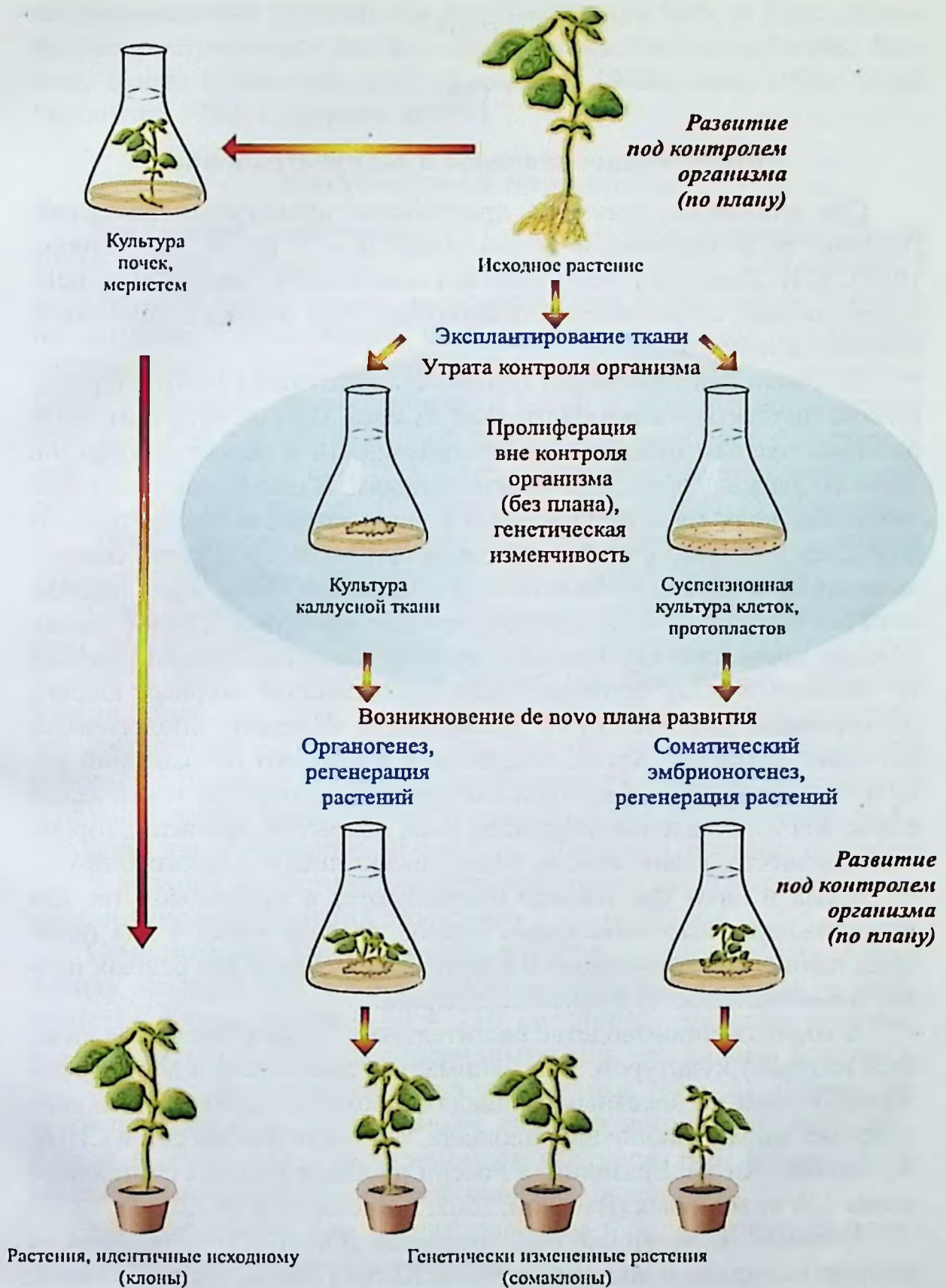


Рис. 2. Схема возникновения соматклональных вариаций

Глава 2

СОЯ

Хозяйственное значение и распространение

Соя считается одним из древнейших культурных растений. История ее возделывания насчитывает 6 – 7 тысяч лет (Енкен, 1959). Н.И. Вавилов (1966) включал сою в число первичных, наиболее древних сельскохозяйственных культур, наряду с пшеницей, ячменем и просом.

Из семян сои производят белковые концентраты и структурированные продукты – аналоги изделий из мяса. Они не уступают натуральным мясным продуктам по питательности и переваримости, но намного дешевле обходятся производителям. В настоящее время значительная доля мясной продукции в мире заменена продуктами из сои. Соевое молоко считается ценным пищевым продуктом, способным служить заменителем молока для пищевых целей и для вскармливания молодняка сельскохозяйственных животных. Соевое масло, обладая хорошими вкусовыми и кулинарными свойствами, состоит из физиологически активных полиненасыщенных жирных кислот, незаменимых для животного организма, и содержит биологически активные вещества. Кроме пищевого и кормового направлений использования, белок и масло сои находят применение как техническое сырье для изготовления пластмасс, клея, покрытий, пропиток, взрывчатых веществ, лаков, красок, мыла, инсектицидов и многого другого. Жмых и шрот сои широко используются в животноводстве для приготовления высокобелковых кормов, зеленая масса – для непосредственного скормливания и в виде сена и силоса. На бедных почвах соя возделывается в качестве сидерата.

В мировом производстве растительного белка и масла соя является ведущей культурой. Она занимает первое место в мире среди зернобобовых по посевным площадям и возделывается на пяти континентах мира. Наибольшие площади занимают посевы сои в США, Аргентине, Китае, Бразилии; в России площади под ней составляют менее 1% от мировых (Васякин, 2002; Кашеваров и др., 2004).

Родиной культурной сои считается Юго-Восточная Азия, а именно северные и восточные части Китая (Енкен, 1959; Вавилов, 1966; Синская, 1969; Жуковский, 1971). Здесь же находится центр генетического разнообразия данной культуры. Предком ее являет-

ся дикорастущая уссурийская соя *Glycine soja* Sieb. et Zucc., широко распространенная на Дальнем Востоке России, в Китае, Японии, Корее (Скворцов, 1927; Корсаков, 1973а; Ала, 1976; Singh, Nymowitz, 1988; Сеферова, 2001а).

Систематика и морфология

Род *Glycine* L. насчитывает 11 видов из двух подродов: *Glycine* Willd. и *Soja* (Moench.) F. Y. Hegm. К первому из них относят 9 многолетних диких видов, произрастающих в Австралии, Китае и на островах Тихого океана и обладающих ценными признаками скороспелости, устойчивости к болезням, высокого содержания белка в семенах, многосемянности бобов и повышенного количества бобов на растении. Второй подрод *Soja* включает культурный вид (культиген) *G. max* (L.) Merr. и дикорастущую уссурийскую сою *G. soja* Sieb. et Zucc. (*G. ussuriensis* Reg. et Maack) (Лещенко и др., 1990; Сосудистые растения..., 1996). Культурная и дикорастущая соя способны скрещиваться между собой (Ала, 1984).

Соя *Glycine max* (L.) Merr. [*Phaseolus max* L.; *Dolichos soja* L.; *Soja hispida* Moench; *Phaseolus sordidus* Salisb.; *Soja japonica* Savi; *S. viridis* Savi; *S. angustifolia* Miquel; *Glycine hispida* (Moench) Maxim.; *Soja max* Piper; *Glycine gracilis* Skvortz.] – соя культурная, соя щетинистая – однолетнее травянистое растение из семейства бобовых с прямостоячим или завивающимся стеблем, ветвящимся в нижней части, покрытое короткими грубыми волосками от белой до темно-коричневой окраски. Корневая система стержневая, в верхней ее части обычно присутствуют округлые клубеньки симбиотических бактерий диаметром 2 – 4 (до 8) мм.

Семядоли при прорастании выносятся на поверхность. Гипокотиль зеленый или с антоциановым оттенком. Стебель у большинства сортов высотой 60 – 110 см. Листья сложные с тремя, редко с пятью крупными яйцевидными или овальными листочками; боковые листочки часто асимметричные (рис. 3). Форма листьев определяется соотношением длины и ширины средних листочков в сочетании с характером их контуров. В.Б. Енкен (1959) выделял следующие основные формы листочков:

- *широкояйцевидная* с притупленным или заостренным окончанием (отношение длины к ширине 1:0,8);
- *овально-заостренная* и *овально-удлиненная*, когда длина значительно больше ширины (отношение 1:0,7), степень заострен-

ности верхушки может варьировать, но притупленных окончаний не встречается;

- *клиновидная* форма характеризуется резким преобладанием длины над шириной (отношение 1:0,5);

- *ланцетная* форма.

Поверхность листовой пластинки в большинстве случаев более или менее гладкая, реже встречаются морщинистые листья с небольшими вздутиями. В засушливых условиях степень морщинистости усиливается. Поверхность листьев связана с размером и формой: узкие и мелкие листья обычно гладкие, а у крупных и широких листьев, особенно с притупленной верхушкой, часто бывает морщинистая поверхность.

Цветки мелкие, почти без запаха, собраны в кистеобразных пазушных соцветиях; венчик фиолетовый или белый. Завязь одногнездная с одним плодолистиком и несколькими семязпочками.

Бобы длиной 3 – 7 см, шириной 0,5 – 1,5 см, прямые, изогнутые, серповидные, опушенные, редко голые, серые, коричневые, бурые или черные. Число семян в бобе от 1 до 4, чаще 2 – 3.



Рис. 3. Соя (по Б. В. Скворцову, 1927)

1 – побег с цветками; 2-5 – цветок; 6 – чашечка; 7-9 – части венчика; 10-11 – завязь; 12 – пыльник; 13 – пыльцевые зерна; 14 – узел с бобами; 15 – семена.

Семена крупные, масса 1000 семян от 100 до 250 г, форма шаровидная, овальная, округло-плоская, удлинненно-округлая, почковидная; поверхность блестящая или матовая; окраска семенной оболочки желтая, янтарная, зеленоватая, коричневая, черная, пестрая; семядоли желтые или зеленые. Рубчик крупный, овальный, реже клиновидный или линейный, окраска его может отличаться от окраски семенной оболочки.

В результате изучения мировой коллекции сои В.Б. Енкен (1959) в пределах вида выделил следующие 6 географо-экологических подвигов:

Ssp. gracilis – полукультурный (изящный). Среднеспелые формы высотой от 50 см до 2 м, с повышенной ветвистостью. Стебли очень тонкие, нежные, часто стелющиеся и вьющиеся. Опушение редкое, беловатое или светло-рыжевато-белое, листья мелкие, овальные. Бобы короткие и узкие, семена очень мелкие.

Ssp. slavonica – славянский. Балканская вторичная группа сортов. Растения высотой 40 – 60 см, многоцветковые, стебли тонкие, чаще лежащие, цветки и бобы в приземной части куста, семена мелкие. Известны популяции добружанка (болгарская) и унгеройка (венгерская).

Ssp. indica – индийский. Сильно разветвленные кусты до 2 м высотой, цветки мелкие, бобы средние, семена очень мелкие, сорта наиболее позднеспелые.

Ssp. chinensis – китайский. Растения до 1 – 1,5 м высотой, ветвистые, цветки средней величины, лиловые. Бобы короткие или средние. Семена мелкие, но крупнее индийских. Сорта позднеспелые.

Ssp. manshurica – маньчжурский. Растения 60 – 90 см высотой, ветвистость средняя, стебли менее грубые, чем у китайских и индийских форм, кисти короткие; малоцветковые. Бобы средней длины (4 – 4,8 см), семена более крупные, чем у китайских и индийских форм, чаще всего желтые. Сорта среднеспелые, высокомасличные.

Ssp. kogejensis – корейский. Растения 60 – 110 см высотой, ветвистость средняя, стебли грубые, толстые, листья и цветки крупные, кисти длинные, многоцветковые. Бобы крупные или средние. Семена наиболее крупные, высокобелковые. Высокорослые формы позднеспелые, низкорослые – скороспелые.

Н.И. Корсаков (1973а) различал 5 подвидов, объединив индийский с китайским, славянский с маньчжурским и выделив культурный и дикорастущий (уссурийский) подвиды. Для удобства апробации сортов В.Б. Енкен установил апробационные группы, определяемые по признакам зрелого растения.

Экология и онтогенез

Соя по своей природе – растение короткого дня, чувствительное к фотопериоду, поэтому сорта ее дифференцированы по широте культивирования. При выращивании в северных широтах южные сорта сильно затягивают сроки начала цветения и созревания, увеличивают период вегетации. Специализированные сорта северного экотипа (Северная 4, Fiskeby 3, Fiskeby 5) в более южных широтах становятся низкопродуктивными карликами (Булах, 2004). Сорта, нечувствительные к фотопериоду, имеют большое значение в селекции; многие отечественные образцы созданы В.И. Сичкарем с коллегами (Лещенко и др., 1990).

Продолжительность вегетационного периода является важной характеристикой сорта, в сильной степени зависящей от температурного режима. Поэтому более точным показателем скороспелости, генетически обусловленным и стабильным, служит сумма активных температур. Ультраскороспелые сорта с вегетационным периодом менее 80 дней способны развиваться при сумме активных температур менее 1700°C, но отличаются низкой продуктивностью. Очень скороспелые сорта созревают за 81 – 90 дней при сумме активных температур 1700 – 1900°C; скороспелые за 91 – 110 дней при 1900 – 2200°C. Климат Западной Сибири не способен обеспечить надежное созревание среднеспелых и тем более позднеспелых форм сои с продолжительностью вегетации 170 и более дней.

Соя – мезофильное растение, довольно требовательное к теплу и влаге в период налива семян, поэтому в нашей стране она традиционно возделывается на юге Европейской части и Дальнего Востока. Согласно агроклиматической оценке территории СССР, проведенной В.М. Степановой (1970, 1985), в Западной Сибири нет территорий, благоприятных для возделывания сои. Критический период в развитии (начало цветения – формирование семян) в условиях южной лесостепи Западной Сибири приходится на июль, который в среднем на 4°C холоднее, чем в Краснодаре, а по количеству осадков уступает Благовещенску на 55 мм (Васякин,

2003). Первая половина вегетации у скороспелых сибирских сортов, в том числе у СибНИИК 315, проходит при пониженных среднесуточных температурах и меньшей сумме осадков, а цветение и созревание обеспечены теплом и осадками лучше, чем в европейской части страны (Кашеваров и др., 2004). Это говорит о существенных изменениях адаптивных свойств и ритмов развития у сортов сои сибирского экотипа. Результаты многолетних исследований Н.И. Васякина (2002, 2003) подтверждают лимитирующий характер влияния на урожайность сои гидротермических условий июля.

В.Б. Енкен (1959) определил минимальную температуру, необходимую для прорастания семян сои $6...7^{\circ}\text{C}$, появления всходов $8...10^{\circ}\text{C}$, формирования генеративных органов и цветения $16...18^{\circ}\text{C}$, созревания семян $8...9^{\circ}\text{C}$. Биологический минимум для роста и развития сои составляет 10°C , оптимальная температура для любой фазы развития не опускается ниже 20°C . Всходы выдерживают кратковременные понижения температуры до -3°C . Осенние заморозки в пределах $-2...-2,5^{\circ}\text{C}$ не повреждают семена, но более низкие температуры в период налива нарушают развитие семян в верхнем ярусе, вызывают подмерзание листьев, гибель цветков и зеленых бобов.

Соя довольно устойчива к засухе в первой половине вегетации. По отношению к влагообеспеченности В.Б. Енкен (1959) считал критическим периодом фазу образования семян. Т.А. Васильева (1989), изучавшая проблему засухоустойчивости сои в вегетационных опытах, пришла к выводу, что характер расходования воды растениями разных сортов определяется главным образом условиями среды, а не генотипом; следовательно, устойчивость сои к засухе обусловлена не экономным расходованием воды, а иными причинами.

Поскольку родина сои расположена в регионе с муссонным климатом, она довольно легко переносит избыточное увлажнение и даже 2-недельное затопление, имея адаптивные механизмы для продолжения жизнедеятельности и нейтрализации повреждений: отрастание воздушных корней у всходов, развитие новых листьев взамен отмерших.

Сою можно выращивать на самых разных почвах, за исключением солонцов, солончаков, заболоченных и кислых почв. Она способна расти на бедных почвах, но при этом снижает урожай-

ность. Оптимальное значение рН 6,5 – 7. Высокие урожаи соя дает на хорошо аэрируемых плодородных почвах при внесении азотных (30 – 40 кг/га действующего вещества), фосфорных и калийных удобрений (Кашеваров и др., 2004). Важным свойством сои является симбиоз с клубеньковыми бактериями рода *Rhizobium*, способными обеспечить при благоприятных условиях фиксирование 200 – 250 кг/га азота воздуха за вегетацию.

На разных фазах развития соя поражается фузариозом, серой и белой гнилью, аскохитозом, бактериозом, морщинистой и желтой вирусной мозаикой, антракнозом, церкоспорозом и другими грибными, бактериальными и вирусными болезнями, которые в годы эпифитотий значительно снижают урожай. Потери урожая семян от грибных болезней составляют 22 – 30%, при этом содержание белка в семенах пораженных растений уменьшается до 16%. Бактериальные и вирусные болезни снижают урожайность на 29 – 37%, а содержание белка на 4 – 9 и 7 – 19% соответственно (Корсаков, 1973 б). На сое обитают многие виды вредителей: проволочники, долгоносики, блошки, жуки-листоеды, полевые клопы, луговой мотылек, подгрызающая и люцерновая совки, соевая моль, а также соевая плодожорка и паутинный клещ (Торопова и др., 2002; Кашеваров и др., 2004).

Вегетационный период сои делится на 5 основных фаз: всходы, ветвление, цветение, плодообразование, полная спелость. Если длину вегетационного периода принять за 100%, то период всходы – начало цветения займет 35% времени, цветение – 25%, образование плодов и семян – 30%, созревание – 10%, с отклонениями у разных сортов и в зависимости от условий года (Васякин, 2002).

Жизненный цикл сои и особенности морфогенеза изображены на рисунке 4 (Рейвн и др., 1990). Заложение цветочных бугорков у скороспелых форм происходит очень рано, в фазе двух настоящих листьев. Развитие цветка и завязи включает восемь фаз, причем подготовка к опылению проходит в течение первой и второй фаз, а созревание тычинок, высыпание пыльцы на клейкое рыльце и оплодотворение – в третьей и четвертой фазах, когда лепестки еще плотно сомкнуты (Енкен, 1959). Венчик начинает раскрываться через 15 – 30 минут после прорастания пыльцы. При недостатке тепла цветки не раскрываются, что не мешает их опылению.

Таким образом, устройство цветка и ход процесса опыления говорят о приспособленности сои к самоопылению. М.А. Вишня-

кова, изучая эволюцию семенного размножения в семействе *Fabaceae*, пришла к выводу о связи автофертильности зерновых бобовых, в том числе *G. max* и *Cicer arietinum*, с длительной доместикацией. Клейстогамия у этих видов отсутствует, но им присуща бутонная автогамия контактного типа, когда оплодотворение осуществляется в бутоне путем непосредственного контакта рыльца и пыльников (Вишнякова, 2003; 2004). Невзрачные цветки сои могут посещаться шмелями, пчелами и осами. Спонтанная естественная гибридизация происходит очень редко с частотой 0,1 – 0,2, иногда до 0,5%. Неблагоприятные условия среды (понижение температуры, засуха, очень высокая влажность воздуха) вызывают опадение цветков и завязей.

Семена сои гигроскопичны, имеют тонкую кожуру и при хранении быстро теряют всхожесть, особенно со светлой окраской оболочки. По данным Кубанской станции ВИР, через 9 лет хранения желтые и зеленые семена имели всхожесть 8 – 10%, а коричневые и черные с более прочной семенной оболочкой 31 – 32% (Енкен, 1959).

Биохимические признаки

В семенах сои содержится 35 – 52 % белка и 17 – 27 % жира, витамины А, В, С, D, Е, ряд ферментов. Сено сои при 11%-ной влажности содержит в среднем 15% белка, 5% жира, 23% клетчатки, 7% золы, 39% безазотистых экстрактивных веществ.

Соевый белок представлен в основном (до 94%) легкорастворимыми фракциями (альбумин 8 – 25%, легкорастворимый глобулин 59 – 81%), что выгодно отличает ее от гороха, люпина и других зернобобовых (Корсаков, 1973б). В белке сои присутствуют почти все аминокислоты, а лизина в 9 раз больше, чем в белке пшеничной муки. Отношение незаменимых аминокислот к белкам у сои составляет 50%; по этому показателю она превосходит стандарт ФАО более чем вдвое и уступает только нуту (Кашеваров и др., 2004). Кроме того, белок сои обладает ценным свойством створаживания, подобно казеину молока. Содержание белка в семенах сои увеличивается в засушливые годы и у более скороспелых сортов (Васякин, 2002).

Соевое масло содержит до 55% незаменимой линолевой кислоты (С 18:2) и 1,7 – 3,2% фосфатидов, регулирующих обменные процессы в животных организмах, а также токоферол (витамин Е).

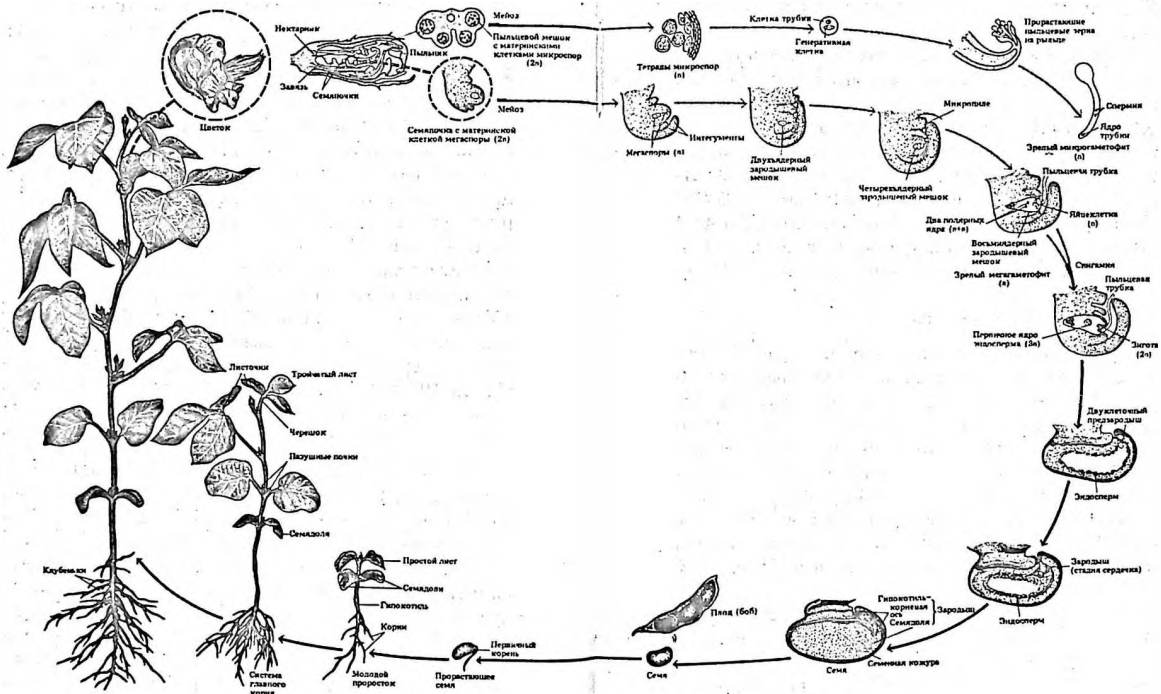


Рис. 4. Жизненный цикл сои (по Рейну и др., 1990)

Несмотря на высокие достоинства соевой продукции, требуют решения известные проблемы ее качественного состава. В соевом масле присутствует 8% линоленовой жирной кислоты (С 18:3), нестабильной на воздухе и на свету, из-за чего портится вкус и запах масла. Около 3% сухой массы семян составляют лектины или гемагглютинины из группы гликопротеинов, вызывающие агглютинацию красных кровяных телец в крови животных. До 6% массы семян приходится на белки – ингибиторы трипсина, пищеварительного фермента животных. Фермент липоксигеназа способствует быстрому окислению ненасыщенных жирных кислот, определяя неприятный вкус и запах продуктов. В соевом белке, который в целом хорошо сбалансирован для потребления животным организмом, мало метионина (Лещенко, 1990; Barwale, Widholm, 1990).

Генетика сои

Соя *G. max* имеет диплоидный набор хромосом ($2n=40$). Дикорастущая *G. soja* Sieb. et Zucc., широко распространенная на Дальнем Востоке России, в Китае, Японии, Корее, имеет то же число хромосом, независимо от географического района произрастания и экологической ниши (Пробатова, Рудыко, 1981; Сеитова и др., 2004). Генетика сои довольно хорошо изучена, что в сочетании с легкостью культивирования суспензий клеток и протопластов способствовало ранним успехам генноинженерных проектов (Hildebrand et al., 1986). Первыми отечественными исследователями генетики сои были Л.А. Декапрелевич и А.К. Лещенко (Лещенко, 1962; Лещенко и др., 1990).

Изучены генетические механизмы устойчивости сои к ряду болезней и вредителей, известны гены основных биохимических признаков, определены изоферментные системы и ДНК-маркеры, которые широко используются для идентификации сортов и выявления филогенетических связей с дикорастущими видами (Корсаков, 1982; Лещенко и др., 1987, 1990; Tsukamoto et al., 1993; Сиволап и др., 1998; Jin et al., 1999; Rahman et al., 1999; Manjaya, Pawar, 1999; Ludwig, Tenhaken, 2000; Meesang et al., 2001; Beilinson et al., 2002; Gesteira et al., 2002; Piffer et al., 2002; Ma et al., 2003; Сеитова и др., 2004).

Cary и Nickell (1999) провели генетический анализ признака коротких черешочков в сложном листе. Gerber с коллегами (2000) занимаются изучением генетики биохимических признаков семян

с помощью капиллярного гель-электрофореза. В.И. Глазко (2000) исследовал генетически детерминированный полиморфизм ферментов сои.

Эволюция признаков сои, по мнению Н.И. Корсакова (1982), соответствует филогенезу рода. Так, мелколистность, мелкозерность, тонкостебельность, темная окраска семенной оболочки и рубчика, растрескиваемость бобов после созревания, чувствительность к фотопериоду присущи филогенетически старым видам и являются доминантными признаками. В роде *Glycine* L. наблюдается чрезвычайный полиморфизм признаков вегетативных и генеративных органов и выделяются гомологические ряды в наследственной изменчивости. В пределах каждого вида найдены формы ранне- и позднеспелые, мелко- и крупнолистные, опушенные и голые, с антоциановой окраской и без нее, и т. п. Культурная соя отличается наибольшей полиморфностью по многим признакам.

Н. И. Корсаков и П.П. Булах (1978) установили, что продолжительность периода вегетации – признак с полигенным наследованием, демонстрирующий фенотипическое доминирование среднеспелости, которая контролируется аллелями «дикого» типа.

Признак неограниченного роста стебля, свойственный диким формам, является доминантным и контролируется геном Dt1. Промежуточный тип роста определяется другим доминантным геном Dt2. Фасциация стебля и карликовость – результаты рецессивных мутаций. Высокородность и часто связанная с ней позднеспелость – доминантные, филогенетически более ранние признаки. Широкий средний листочек тройчатого листа – признак доминантный, как и блестящая поверхность, а опадение листьев при созревании вызвано рецессивным геном.

Дикие и малокультурные формы сои имеют темную окраску опушения, которая доминирует над светлой. Отсутствие опушения контролирует доминантный ген. Венчик цветка у диких форм имеет фиолетовую окраску (доминантный признак), а белая окраска венчика у некоторых сортов – действие рецессивного аллеля. Темно-коричневая и черная окраска бобов контролируется доминантными, а светлая – рецессивными аллелями. Известны серии генов, определяющие окраску семенной оболочки или рубчика, причем темная окраска соответствует филогенетически старой форме выражения признака. Нечувствительность к длине светового дня обеспечивается одним или несколькими рецессивными генами.

Способность к симбиозу с разными расами клубеньковых бактерий также находится под генетическим контролем.

Количественные признаки сои контролируются путем полигенного наследования, изменчивость их зависит от условий выращивания. Н.И. Корсаков и П.П. Булах (1978) на базе дальневосточного экспериментального материала выделили 6 групп изменчивости признаков:

1. Изменчивость на 91 – 100% определяется генотипом (окраска различных органов: кожуры и рубчика семени, венчика цветка, боба, опушения);

2. Изменчивость на 79 – 89% обусловлена генотипом (ширина и длина боба, величина семян, ширина листочка);

3. Изменчивость на 70 – 71% зависит от генотипа (длина вегетационного периода, форма семян, толщина стебля, длина листочка);

4. Изменчивость на 45 – 53% обусловлена генотипом (форма куста, число семян в бобе, угол отхождения ветвей от стебля);

5. Изменчивость на 31 – 41% зависит от наследственных особенностей (длина междоузлий, ветвистость, высота растений, число бобов, характер роста стебля);

6. Доля генетического фактора в изменчивости 19 – 29% (растрескиваемость бобов, высота прикрепления нижнего боба, облиственность, масса семян 1 растения). Эти признаки сильно зависят от погодных и агроэкологических факторов, их коэффициент вариации достигает 18 – 27%.

Направления и методы селекции

Увеличение урожайности сои в условиях Сибири обеспечивается оптимальным сочетанием комплекса элементов продуктивности с повышенной адаптивностью сорта к условиям возделывания (пониженным положительным и отрицательным температурам, засухе, болезням и вредителям). Хозяйственная ценность сорта, наряду с продуктивностью, определяется качеством зерна (Васякин, 2002). Сорта сои для Западной Сибири должны обладать следующими свойствами:

- Вегетационный период (посев-созревание) 90 – 110 дней;
- Высота растения 60 – 80 см;
- Высота прикрепления нижнего боба выше 12 см;
- Масса 1000 семян 100 – 120 г;
- Средняя урожайность семян 2,0 – 2,5 т/га;

- Содержание белка 38 – 40 %;
- Содержание жира 18 – 20 %;
- Форма куста полусжатая или сжатая с углом отхождения ветвей 25 – 30°;
- Устойчивость генеративных органов к опадению;
- Устойчивость к фузариозу, бактериозу, другим болезням и вредителям;
- Устойчивость к полеганию стебля, облому ветвей;
- Устойчивость к растрескиванию бобов при созревании;
- Устойчивость к механическому повреждению семян при обмолате.

В селекционной работе с соей высокую эффективность показали различные виды индивидуального отбора из местных сортов и коллекционных образцов (Енкен, 1959; Простакова, Бронштейн, 1989; Barwale, Widholm, 1990; Горин, 1994; Spehar, Souza, 1999; Singh, Nymowitz, 1999; Фоменко, 2000; Васякин, 2002; Ващенко и др., 2004). Наибольшее распространение получил метод педигри, применяется также метод отбора одного семени.

Для большинства селекционеров основным ресурсом расширения генетической изменчивости как базы отбора является экспериментальная и спонтанная гибридизация (Лещенко, 1962; Кузин, Рязанцева, 1972; Мякушко, 1973; Лунин, 1988; Ала В.С., 1990; Ала А.Я., 2001; Булах, 1990; Толоконников, 1999; Дудина, Горин, 1999; Carpentieri-Pipolo et al., 2000; Манакова, 2001; Трембак, 2001; Гайдукович, Омельянюк, 2002;).

В середине XX века получали исходный материал методом вегетативных прививок, что, по словам В.Б. Енкена (1959), при правильно подобранном подвое повышало изменчивость количественных и качественных признаков в потомстве привоя и давало возможность отбора ценных новообразований во втором и особенно третьем поколениях. Перспективные образцы были созданы А.К. Лещенко, Е.И. Тюгиной, Ф.Д. Коган, К.К. Малышем. Сорт сои Юбилейная (ВНИИ сои) выведен методом индивидуального отбора из гибридной популяции от скрещивания потомства вегетативной прививки Амурской 21 на Амурскую 51 (Лавриненко и др., 1978). Интересно, что именно этот сорт оказался наиболее склонным к мутациям в исследованиях по экспериментальному мутагенезу (Кузин, Рязанцева, 1972).

Многие сорта и формы сои получены с использованием физических и химических мутагенов (Лещенко, 1945, 1962; Енкен, 1959; Лещенко и др., 1987; Кирилленко, Похвалитый, 1994; Кирилленко и др. 1994; Rahman et al., 1994; Алексиева, 2000; Казьмин, Комолых, 2000; Красковская, 2003).

Интересный селекционный материал создан биотехнологическими методами с использованием эмбриокультуры и гибридизации *in vitro*, соматической изменчивости, клеточной селекции (Roth et al., 1984; Hildebrand et al., 1986; Polacco et al., 1989; Barwale, Widholm, 1990; Фисенко, Мудрик, 2000; Мудрик и др., 2000; Taregyan et al., 2001; Дега и др., 2003; Фисенко и др., 2003). В последнее десятилетие в США и других развитых странах расширяется производство генетически модифицированных форм сои (Dale et al., 1993; Falco et al., 1995; Baker, Carter, 1996; Gertz et al., 1999; Dan, Reichert, 1999).

Развитие исследований по культуре тканей сои *in vitro*

Регенерация целого растения из недифференцированных клеток – необходимый этап любой технологии *in vitro*, применяемой в растениеводстве и селекции, однако соя в этом отношении долгие годы не поддавалась усилиям исследователей.

Gamborg с сотрудниками в 1968 г. опубликовали состав питательной среды В5 для каллусной и суспензионной культуры сои (Gamborg et al., 1968). К.Н. Као с коллегами (1970) сообщили о делении клеток в культуре протопластов, D.R Elvers с сотрудниками (1974) освоили культуру пыльников. Легкость культивирования клеточных суспензий сои привела к раннему развитию технологий культуры изолированных протопластов и генетически модифицированных клеток, но регенерация растений долго не удавалась (Barwale, Widholm, 1990).

В экспериментах Cheng и Saka с коллегами (Cheng et al., 1980; Saka et al., 1980) были получены растения-регенеранты сои из семядольных узлов, причем из одного экспланта формировалось до 11 побегов. Т. Kameya и J.M. Widholm (1981) добились регенерации растений разных видов *Glycine* из отрезков гипокотилей, G.C. Phillips и G. B Collins (1981) получили соматические эмбрионы сои. M.L. Christianson и сотрудники в 1983 г. сообщили о морфогенной суспензионной культуре тканей незрелых зародышей (Christianson et al., 1983a,b). Наконец, в 1985

– 1987 г.г. многие зарубежные исследователи опубликовали разработанные ими методики регенерации растений из тканей различных эксплантов сои путем органогенеза и соматического эмбриогенеза (Ranch et al., 1985, 1986; Lazzeri et al., 1985; Li et al., 1985; Barwale et al., 1986a,b; Nymowitz et al., 1986; Chazi et al., 1986; Wright et al., 1986; 1987).

К тому времени и перед российской наукой была поставлена задача разработать технологию регенерации в культуре *in vitro* отечественных сортов сои (Шевелуха, 1986). Вскоре ученые из ВНИИ сои сообщили об успешном получении растений *in vitro* в культуре тканей сортов, районированных в Амурской области (Донцова, 1989; Соловьев, 1990; Соловьев, Родина, 1990).

В начале 90-х годов в Приморском НИИСХ П.П. Фисенко с коллегами добились регенерации растений из тканей незрелых семядолей и семядольных узлов путем органогенеза и соматического эмбриогенеза (Фисенко, Галукян, 1992; 1994; Хохлова, Фисенко, 1994). В это же время в Сибирском НИИ кормов развернулись наши исследования по разработке регенерационных систем на базе уникального сорта СибНИИК 315 (Рожанская, Клеблеева, 1994).

Материал и методика исследований

Характеристика сорта сои СибНИИК 315. Сорт сибирского экотипа создан в СибНИИ кормов В.Е. Гориним с сотрудниками путем отбора из шведского сортообразца коллекции ВИР к-5828. По мнению авторов, причиной изменчивости в коллекционном образце явилась спонтанная гибридизация (Горин, 1994). Сорт относится к маньчжурскому подвиду и входит в апробационную группу *sordida*. Растения высотой 50 – 80 см, зеленые с коричневым опушением, формируют компактный куст с 1 – 4 ветвями и 10 – 12 междоузлиями. Тип роста промежуточный. Высота прикрепления нижнего боба 8 – 10 см. Лист тройчатосложный с широкояйцевидными листочками. Соцветие – кисть с 2 – 5 фиолетовыми цветками. Бобы слабоизогнутые, четковидные, 2 – 3-семянные, с густым рыжим опушением, при созревании желто-бурые. Семена округлые, светло-желтые, рубчик коричневый, масса 1000 семян 160 – 180 г. Период вегетации 90 – 110 дней. Сорт устойчив к полеганию и растрескиванию бобов, засухоустойчив, средняя урожайность 1,6 т/га, максимальная 2,8 т/га. Содержание белка в семенах 35 – 40, жира 17 – 20%.

Сорт районирован с 1991 г. и допущен к использованию в производстве по Волго-Вятскому, Средневолжскому, Уральскому, Западно-Сибирскому и Восточно-Сибирскому регионам России и в Республике Казахстан (Каталог сортов..., 2003; Кашеваров и др., 2004).

Основной задачей на первом этапе стала разработка эффективных методик культуры *in vitro* и регенерационных протоколов для отечественных сортов сои. Кроме СибНИИК 315, источником эксплантов служил сорт Рассвет селекции ВНИИ сои.

Лабораторные опыты позволяют определить параметры химических и физических факторов, индуцирующих процессы морфогенеза *in vitro*. Это прежде всего питательные вещества, фитогормоны, температура и свет. Экспланты размещаются на различных вариантах питательной среды в разных условиях. Условия культивирования специфичны для разных сортов и органов растений. Индикатором активности факторов служит направление и скорость процессов морфогенеза, происходящих в ткани экспланта при данных условиях. В лабораторных опытах учитывали следующие показатели:

- частоту образования каллуса, корней, эмбриоидов, органоидов, побегов в процентах от общего количества эксплантов в опыте;
- количество побегов, листьев, корней, генеративных органов, эмбриоидов, органоидов на каждом экспланте;
- морфологические особенности каллусов, корней и регенерантов: объем или массу, длину, толщину, форму, цвет, консистенцию, наличие хлорофилла, антоциана, опушения.

Основными типами эксплантов в наших опытах являлись фрагменты асептических проростков и молодых растений сои. Для введения в культуру *in vitro* семена дезинфицировали 30-процентной перекисью водорода с добавлением моющего средства в течение 30 минут, затем проращивали в стерильных чашках Петри. Экспланты из зародышей, семядолей, гипокотилей, корней, листьев помещали на агаризованные питательные среды Гамборга B5 (Gamborg et al., 1968) или MS (Murashige, Skoog, 1962) с различными добавками (табл. 1), почки проростков переносили на среды без гормонов с уменьшенной концентрацией минеральных солей для выращивания асептических растений – источников эксплантов. Культуры инкубировали при 18 – 24°C, освещенности 1 – 3 тыс. лк, 16-часовом фотопериоде.

Т а б л и ц а 1

Питательные среды и фитогормоны для регенерации сои

Среда + фитогормоны, мг/л	Эксплант
H ₂ O	семядоля
1/2 B5	семядоля
1/2 B5 + БАП 0,5	семядоля
B5 + кинетин 1 + 2,4-Д 0,3	семядоля
B5 + БАП 3	семядольный узел
MS + БАП 0,5	семядольный узел
MS+БАП 1	ось зародыша
MS + БАП 2	семядольный узел
MS + БАП 4	гипокотиль
1/2 B5 + кинетин 0,5	стеблевой узел

Молодые растения-регенеранты размножали путем клонирования в культуре стеблевых узлов, через 3 – 4 недели растения с корнями и листьями высаживали в горшки с почвой. Регенерационные системы сорта СибНИИК 315 были созданы на базе зрелых семядольных узлов и семядолей, семена получены *in vitro* или после пересадки растений R₀ в горшки с почвой.

Полевые испытания соматклонов проводились с 1998 г. Полевые исследования позволяют выявить качественную и количественную изменчивость морфологических, физиологических и биохимических признаков и выделить генетически стабильные линии с полезными изменениями для использования в селекции.

Семена регенерантов R₀ и последующих поколений высевали в специальных питомниках (рис. 5) вручную на глубину 5 см при площади питания 5 x 60 см, с контролем (исходным сортом) через каждые 10 номеров. В течение вегетационного периода проводили фенологические наблюдения, учеты заболеваний и повреждений, измерения высоты растений, оценки общего состояния и морфологических особенностей в соответствии с методическими указаниями Всесоюзного научно-исследовательского института растениеводства им. Н.И. Вавилова (1975; 1981). Продолжительность вегетационного периода сои определяли от даты посева до начала опадания пожелтевших листьев при полном побурении бобов (семена при этом находятся в фазе восковой спелости, и можно начинать уборку снопов). Во время уборки в середине ряда набирали сноп из 20 растений для измерений и подсчетов морфометрических признаков и анализа химического состава семян. Определение содержания белка и жира и другие анализы проведены в аналитической лаборатории СибНИИ кормов по стандартным методикам.

Учет соматоклональных вариаций по качественным признакам осуществляют путем определения частоты встречаемости измененного признака; варьирование количественных признаков удобно оценивать с помощью среднего квадратического отклонения или коэффициента вариации (De Klerk, 1990). Чтобы констатировать наличие соматоклональной изменчивости, критерий вариабельности в популяции регенерантов должен достоверно превышать внутрисортную изменчивость исходного сорта.

Достоверность различий средних определяли с помощью критерия Фишера, корреляции признаков – по Пирсону, а в случаях нарушения нормальности распределения использовали непараметрические критерии статистики и корреляционный анализ по Спирмену (Зайцев, 1973; 1990; Животовский, 1991).

Индукцированный мутагенез. В тот же период времени для создания и изучения дополнительной изменчивости сои мы применяли методы индуцированного мутагенеза. Сухие семена обрабатывали следующими электромагнитными излучениями:

1. красным когерентным светом оптического квантового генератора (лазера) гелий-неонового с длиной волны 632,8 нм и мощностью на выходе 1 мВт;

2. γ -излучением кобальтовой пушки (обработка проводилась в Институте цитологии и генетики СО РАН).

Весной 1998 г. семена сорта СибНИИК 315 были облучены светом лазера в течение 15 минут при плотности потока мощности 0,08 мВт/см² и через месяц высеяны в полевом питомнике. В 1999 г. были высеяны семена сои СибНИИК 315, обработанные дозой γ -излучения 50 грей. Линейные потомства растений из облученных семян испытывали в полевых питомниках (рис. 5) по той же методике, что и соматклоны.

Морфогенез сои *in vitro*

Микроклональное размножение в культуре стеблевых узлов применялось нами для размножения и сохранения ценных генотипов сои. Наилучшие результаты были получены на агаризованной среде В5 с уменьшенной вдвое концентрацией минеральных компонентов, без гормонов (табл. 2). Каждая почка формировала 1 – 2 побега и корни через неделю после начала инкубации, причем у трети эксплантов развивались каллусы в базальной части. Легкость укоренения и наличие каллусной ткани говорят о присутствии

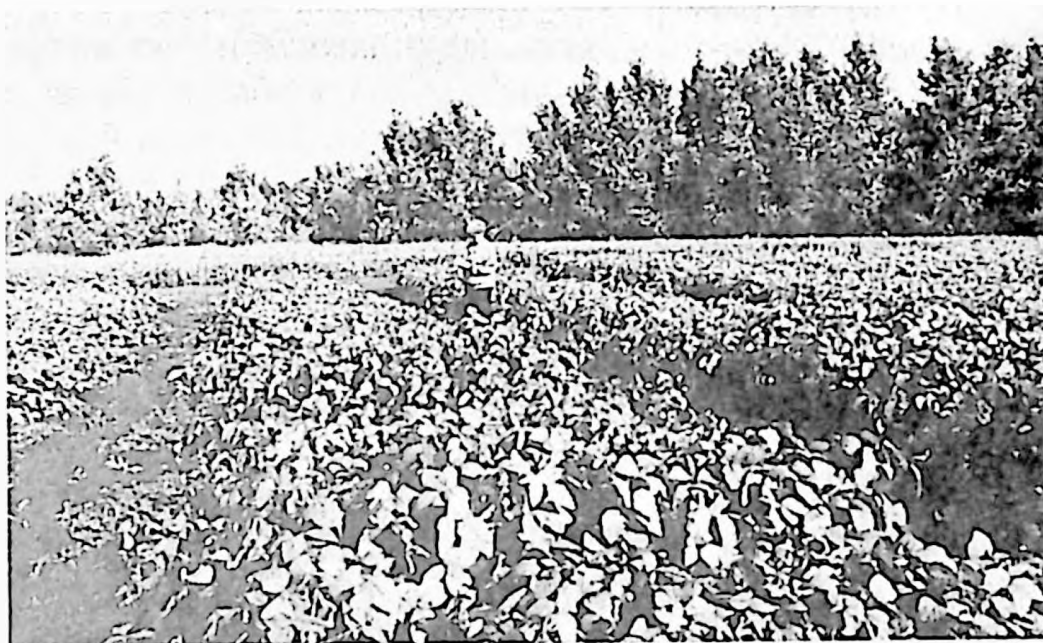


Рис. 5. Питомник полевых испытаний соматклонов и мутантов сои

эндогенных ауксинов в эксплантах. Через три недели побеги высотой около 10 см имели 4 – 6 листьев, в последующие 1 – 2 месяца они цвели и формировали бобы *in vitro*. С каждого растения получали от трех до семи асептических семян с нормальной всхожестью.

Добавление ауксинов и цитокининов неизменно снижало рост и частоту образования побегов, усиливая пролиферацию каллуса. Формирующиеся побеги, достигнув высоты 0,5 – 1 см, чаще всего прекращали развитие и скрывались в разросшемся каллусе. Повышение концентрации БАП вызывало полное подавление стеблевого и корневого морфогенеза и замену его каллусогенезом.

Т а б л и ц а 2
Клонирование сои в культуре стеблевых узлов *in vitro*

Состав среды с добавками, мг/л	Частота морфогенеза, % от числа почек		
	<i>побеги</i>	<i>корни</i>	<i>калус</i>
½ B5	100	100	33
½ B5 + кинетин 0,2	80	75	65
B5 + 2,4-Д 0,3 + кинетин 1	100	100	100
B5 + 2,4-Д 0,3 + БАП 0,1	50	0	100
B5 + НУК 0,5 + БАП 0,1	75	0	100
MS + 2,4-Д 2	13	3	74
MS + БАП 1	44	0	100
MS + БАП 4	0	0	100

Каллусообразование на эксплантах семядолей и листьев происходило на различных питательных средах (табл. 3). Каллусная ткань, рыхлая или плотная, однородная или узловатая, вначале была зеленой, светло-зеленой, светло-желтой, но со временем становилась бежевой и бурой, продолжая рост. На среде MS с добавкой 2,4-Д в концентрации 2 мг/л зеленые участки сохранялись до 6 месяцев без пассирования на свежую среду. Масса ткани, полученной из одной семядоли на этой среде, достигала 7 г. Листовые экспланты давали светло- или серо-зеленый каллус с бурым налетом.

Т а б л и ц а 3

**Влияние состава питательных сред на каллусообразование
в культуре тканей сои**

Среда с добавками, мг/л	Характеристика каллуса	
	<i>из семядолей</i>	<i>из молодых листьев</i>
MS + 2,4-Д 2	Светло-желтый, светло-зеленый, зеленый; рыхлый; имеются корни	Светло- и серо-зеленый
MS + НУК 2 + БАП 2,5	Светло-зеленый и темно-зеленый, рыхлый или плотный; узловатый; имеются корни	-
B5 + НУК 2 + БАП 2,5 + гиббереллин 1	Темно-зеленый и оливковый, плотный, бархатистый	Темно- и светло-зеленый, гладкий или бархатистый
MS + ИУК 0,1 + БАП 0,2 + глутамин 10	Светло-зеленый и ярко-зеленый, мокрый	-
MS + ИУК 0,01 + БАП 0,2 + глутамин 10	Светло-зеленый и ярко-зеленый, мокрый	-
B5 + 2,4-Д 0,3 + кинетин 1	Светло-желтый, светло-и темно-зеленый, бежевый, белый, рыхлый; имеются корни	Светло-желтый и зеленый, влажный, корней мало
B5 + 2,4-Д 0,3 + БАП 0,1	Светло-зеленый; желто-зеленый, белый, плотный	-
B5 + НУК 0,5 + БАП 0,1	Желто-зеленый, темно-зеленый, плотный	-
B5 + НУК 0,5 + БАП 0,1 + гидролизат казеина 100	Зеленый, оливковый, плотный	-
½ B5 + ИУК 0,2 + БАП 0,2	Желто-зеленый и темно-зеленый, плотный; имеются корни	-

На стеблевых эксплантах возникала желто-зеленая влажная или светло-желтая мягкая каллусная ткань. Отрезки корней давали светло-желтый каллус с блестящей поверхностью.

Наиболее интенсивное каллусообразование отмечалось на среде В5 с добавками 2,4-Д 0,3 мг/л и кинетин 1 мг/л, рекомендуемой для получения каллуса из семядолей (Pavlina, 1986). Спустя неделю с начала культивирования на эксплантах семядолей появлялся светло-зеленый рыхлый каллус, в дальнейшем приобретающий желтоватые и буроватые оттенки. Ризогенез начинался через 3 – 4 недели, формируя в некоторых случаях мощные корневые системы.

Эксперименты с внесением в питательные среды фитогормонов и различных добавок (гиббереллина, глутамина, гидролизата казеина) не показали заметного влияния этих веществ на каллусогенез; каллусы не различались как по приросту массы, так и качественно (см. табл. 3).

Культура изолированных семядолей. Зрелые семядоли сои при определенных условиях обладают способностью к морфогенезу (рис. 6). В наших опытах рост каллуса, корней, побегов был более интенсивным при культивировании семядольных эксплантов на средах с минеральной основой В5, чем на MS, хотя характер изменений зависел в большей степени от стимуляторов роста, чем от минерального состава среды (табл. 4).

Каллусообразование на эксплантах семядолей происходило в присутствии всех использовавшихся фитогормонов и их сочетаний,

Т а б л и ц а 4

Культивирование изолированных семядолей сои

Состав среды с добавками, мг/л	Частота, % от числа эксплантов		
	каллусогенез	ризогенез	регенерация
H ₂ O	29	29	7
1/2 В5	50	92	0
1/2 В5 + БАП 0,5	100	71	43
1/2 В5 + БАП 0,2 + ИУК 0,2	100	90	0
В5 + БАП (0,1-1) + 2,4-Д 0,3	100	0	0
В5 + БАП 0,1 + НУК 0,5	100	0	0
В5 + кинетин 1 + 2,4-Д 0,3	100	30 – 100	0 – 25
MS + БАП 1 + 2,4-Д 0,3	100	0	0
MS + БАП 2,5 + НУК 2	100	17	0
MS + 2,4-Д 2	100	25	0

так же как и в отсутствие их. Наличие в среде стимулятора роста не являлось лимитирующим фактором для роста каллусной ткани. Более того, каллус формировался даже без питательной среды, когда семядоли помещали на фильтровальную бумагу, смоченную дистиллированной водой. Это говорит о присутствии в семядолях эндогенных стимуляторов роста и больших запасов питательных веществ. Однако внутренние ресурсы исчерпывались в течение 1 – 3 недель, и каллусные ткани на безгормональных средах быстро прекращали рост, приобретая бурый цвет.

Морфология каллусной ткани была сходной на безгормональных средах и на средах с добавкой ауксинов или кинетина: большой объем, рыхлая консистенция, значительная оводненность, светло-зеленый цвет (см. табл. 3). Добавление в среду цитокинина БАП, не снижая частоты каллусообразования, приводило к изменению структуры ткани: экспланты покрывались тонким (1 – 3 мм) слоем плотного темно-зеленого каллуса с бархатистой поверхностью. Через 2 – 3 недели рост прекращался, ткань приобретала оливковый, затем бурый цвет.

Семядоли сои *in vitro* легко формировали корни на самых различных средах и на воде, с фитогормонами и без, за исключением сред с добавкой сочетания БАП с 2,4-Д. Корни зачастую имели неограниченный рост и достигали 2 – 3 мм в толщину и десятков сантиметров в длину. Такой гипертрофированный ризогенез подавлял образование каллусной ткани и побегов. Формирование корней шло более активно на средах с уменьшенным вдвое содержанием питательных веществ.

При культивировании семядольных эксплантов сои Рассвет на среде В5 с кинетином и 2,4-Д были получены растения-регенеранты (см. табл. 4). Появлению побегов предшествовал интенсивный рост рыхлой бело-зеленой каллусной ткани, а также (хотя и не всегда) толстых белых корней и тонких волосков. Вскоре из массы каллуса появлялся побег с тонким вытянутым стеблем и мелкими зелеными листьями, простыми и тройчатыми. Через 6 недель инкубации при освещенности 1000 лк побеги формировались на 25% эксплантов. В темноте при тех же условиях частота регенерации была вдвое меньше, этилированные побеги имели недоразвитые листья-чешуйки. После клонирования стеблевых узлов на среде $\frac{1}{2}$ В5 развивались нормальные растения. К сожалению, регенерация не отличалась стабильностью: из десяти опытов,

поставленных на этой среде в разное время, формирование побегов из каллуса отмечено только в двух.

Растения-регенеранты возникали всегда из части семядоли, прилегающей к стеблю (рис. 6). В специальных опытах было исследовано распределение ростовой активности семядоли вдоль ее оси (табл. 5). Семядоли делили на две половины: проксимальную и дистальную по отношению к почке, и помещали на питательные среды. Через 3 – 4 недели определяли параметры роста. Относительный прирост массы W_i вычисляли по формуле (Бутенко, 1964):

$$W_i = (m_i - m_0) : m_0;$$

где m_0 – начальная масса экспланта, m_i – масса в конце периода инкубации.

Т а б л и ц а 5

Изменение ростовой активности *in vitro* вдоль оси семядоли
сон СибНИИК-315

Состав среды с добавками, мг/л	Частота, % от числа эксплантов			Длина кор- ней, см	Относительный прирост массы W_i
	каллусо- генез	ризо- генез	регенс- рация		
B5 + кин. I + 2,4-Д 0,3	100	100	0	2,9*	-
	100	79	0	0,3*	
B5 + кин. I + 2,4-Д 0,1	100	92*	8	-	21,6*
	100	40*	0		17,6*
B5 + БАП I + 2,4-Д 0,3	100	0	0	-	21,4
	100	0	0		22,2
MS + БАП I + 2,4-Д 0,3	100	0	0	-	11,1
	100	0	0		10,5

Примечание: в числителе – проксимальная половина семядоли, в знаменателе – дистальная;

*- разница достоверна на 5%-м уровне

На средах с кинетином органогенная активность проксимальной половины была достоверно выше, чем дистальной. На средах с БАП ризогенез и регенерация побегов не происходили, а различия в активности каллусогенеза были статистически недостоверны. Интересно, что среда B5 обеспечивала вдвое больший прирост каллуса, чем MS, при одинаковых гормональных добавках.

Растения-регенеранты из семядолей были получены в ряде опытов по изучению влияния света на процессы морфогенеза (табл. 6). Изолированные семядоли помещались на три варианта

субстрата: 1) фильтровальную бумагу, смоченную дистиллированной водой; 2) питательную среду без гормонов; 3) среду с цитокинином БАП.

На воде и в темноте около половины семядолей давали рыхлый светло-бежевый каллус и корни. Появление побегов на воде отмечалась только на свету, где регенерации предшествовал ризогенез, но каллус не формировался. Свет стимулировал рост каллусной ткани, корней и побегов у изолированных семядолей, помещенных на питательные среды. На безгормональной среде ½B5 семядоли давали длинные толстые корни и реже – каллусную ткань. Включение в среду БАП увеличивало частоту каллусообразования, снижало ризогенез и на свету способствовало регенерации побегов почти у половины эксплантов.

Т а б л и ц а 6

**Влияние питательной среды и света на регенерацию побегов
из семядолей сои СибНИИК 315**

Состав среды с добавками, мг/л	Освещенность, лк	Частота, % от числа эксплантов			Длина корней, см
		каллусо- генез	ризогенез	регенера- ция	
H ₂ O	0	43	57	0	7
	1000	0*	14*	14*	8
½ B5	0	33	83	0	15
	1000	50*	100	0	10
½ B5 + БАП 0,5	0	100	43	0	3
	1000	100	71*	43*	7*

* Разница (темнота – свет) достоверна на 5%-м уровне

Наши наблюдения позволяют считать среду Гамборга B5 более пригодной, чем среду MS, для микроклонального размножения и культивирования зрелых семядолей сои. Среда на основе B5 в разных опытах обеспечивали более активный рост побегов, корней, каллусной ткани (см. табл. 2 – 5).

Mott с соавторами (1984) считали источник азота в среде критическим фактором роста побегов и корней сои, поскольку ионы аммония задерживают ростовые процессы, а нитратный азот способствует росту и нейтрализует действие аммония. Среда Гамборга B5 содержит ионов аммония в 17 раз меньше, чем среда MS, а нитратных ионов – лишь в 1,6 раза. Среда B5 менее богата минеральными солями, что может быть полезно для тканей семядолей

сои с их запасами питательных веществ: использование эндогенного питания стабилизирует ход ассимиляционных процессов, тогда как на богатой искусственной питательной среде избыток ряда элементов может нарушать естественное протекание биохимических реакций.

Свойство сои формировать побеги из семядолей (котилегония) было замечено физиологами давно. Изолированные семядоли на влажной почве на 12-й день давали ростки без простых листьев (Дунин и др., 1933). В.Ф. Марьюшкин и В.К. Даценко (1991) из семядолей разных сортов сои на влажной фильтровальной бумаге наблюдали регенерацию побегов с частотой от 9 до 62%, в зависимости от генотипа. В потомствах регенерантов I и II поколений они не обнаружили хлорофилльных мутаций и изменчивости по продуктивности и маркерным признакам «серое опушение» и «белые цветки». Очевидно, котилегония у сои происходит *via* органо-генез, о чем говорит отсутствие простых листьев, и обеспечивает реализацию резервного варианта выживания, возникшего по каким-то причинам в процессе эволюции вида.

Факты образования каллуса, корней и побегов на безгормональных средах и на воде указывают на присутствие эндогенных стимуляторов роста в семядолях сои. Особенности морфологии каллусной ткани позволяют предположить, что кинетин функционально ближе эндогенному цитокинину сои, чем БАП, поскольку каллусы на средах без гормонов или без цитокининов по своей структуре не отличались от каллусов, формировавшихся на средах с кинетином, тогда как добавка в среду БАП вызывала формирование каллусной ткани совершенно иного вида (см. табл. 3).

О высоком уровне специфических эндогенных фитогормонов говорит и то, что микрклональное размножение сои возможно в отсутствие экзогенных регуляторов роста. Попытки увеличить коэффициент размножения путем введения гормонов в среду всякий раз приводили к подавлению побегообразования и усилению пролиферации каллусных тканей.

Влияние БАП на ткани сои *in vitro* довольно противоречиво. В его присутствии все экспланты приступали к каллусообразованию, но рост каллуса быстро прекращался. Стеблевые узлы сои в присутствии БАП не формировали корней (см. табл. 2), а экспланты семядолей почти всегда снижали частоту ризогенеза и длину корней (см. табл. 4, 5). Добавка БАП в среду в отсутствие экзогенных ауксинов способст-

вовала регенерации побегов из семядолей. Сочетания БАП с 2,4-Д и НУК исключали регенерацию побегов и почти всегда подавляли ризогенез. Для получения растений-регенерантов сои достаточно поместить экспланты семядолей на агаризованную среду В5, разбавленную вдвое, с добавкой БАП (см. табл. 4, 6).

Можно предположить, что БАП, не обладающий достаточным сходством с эндогенным цитокинином сои, создает стрессовую ситуацию для ткани и тем самым производит внешний сигнал, необходимый для начала процессов дифференцировки и формирования побегов. Кинетин же, более сходный с природным гормоном сои, действует мягче и реже вызывает регенерацию. Именно ксеноморфностью БАП для сои можно объяснить его негативный эффект при микроклональном размножении: ведь развитие побегов из почек – естественный процесс, требующий натуральной гормональной поддержки. Что касается ризогенеза, то для его реализации семядоля сои имеет вполне достаточное количество эндогенных фитогормонов, поэтому добавка «чужого» БАП ведет к дестабилизации и замедлению роста корней.

Эксперимент по изучению распределения морфогенной активности тканей семядоли показал, что в присутствии кинетина проксимальная часть семядоли значительно активнее дистальной (см. табл. 5). Это можно объяснить следующим образом. Семядоля служит органом запаса и фотосинтеза у проростка, транспортируя питательные и ростовые вещества от периферических частей к оси побега, в семядольный узел и далее в апикальную зону проростка. После изоляции семядоли путь прерывается и эндогенные продукты накапливаются вблизи среза, формируя материальную базу морфогенеза. Наличие градиента морфогенной активности в изолированных семядолях на средах с кинетином подтверждает наше предположение о физиологической близости кинетина эндогенному комплексу регуляторов роста сои. Наоборот, на средах с БАП не обнаружено никаких различий между половинами семядолей по уровню и характеру морфогенной активности. Очевидно, в этом случае изолированная семядоля функционирует как однородная ткань, а не орган, что можно объяснить нарушением естественных биохимических процессов и блокированием эндогенных фитогормонов под действием БАП.

Умеренная освещенность культивируемых тканей сои определенно стимулировала морфогенез, однако в варианте опыта с водой

(см. табл. 6) каллус формировался только в темноте и ризогенез без света начинался вчетверо чаще, хотя побеги возникали только на свету. Известно, что формирование побегов требует большего количества питательных веществ и энергии, чем рост корней и каллусной ткани. Семядоли на свету в отсутствие экзогенного минерального питания еще способны сформировать побеги с помощью фотосинтеза, тогда как в темноте они лишены этой возможности, а внутренних ресурсов хватает лишь на рост каллуса и корней.

Почему же семядоли в варианте *свет + вода* не дают каллусной ткани? Вероятно, стресс изоляции экспланта от материнского растения и отсутствие питания даёт толчок именно прямой регенерации побегов как самому простому способу выжить. В условиях жёсткого дефицита питания семядоля мобилизует все внутренние резервы, подключает фотосинтез и формирует побег, хотя это удаётся лишь небольшой части эксплантов.

На питательной среде $\frac{1}{2}$ B5 без гормонов ситуация радикально меняется. По-видимому, экзогенное питание снимает остроту стресса эксплантации, и семядоля продолжает процесс транспортировки питательных веществ и фитогормонов к месту среза, где накопленные продукты индуцируют рост каллуса и корней как на свету, так и в темноте. На свету рост усиливается благодаря фотосинтезу в тканях семядоли.



Рис. 6. Регенерация побега в культуре семядолей сои

С добавкой в среду БАП экспланты получают «чужой» гормон, грубо вторгающийся в естественные процессы и выступающий в роли индуктора стеблевого морфогенеза. На свету с помощью фотосинтеза начинается формирование побегов, но в темноте регенерация не происходит. Это можно объяснить нехваткой элементов питания в среде В5 с половинным минеральным составом, что подтверждается данными других опытов, демонстрирующих регенерацию побегов в темноте на среде В5 полного состава (например, описанных на странице 49, см. табл.4).

Итак, уровень содержания эндогенных гормонов в изолированных тканях сои обеспечивает развитие на безгормональных питательных средах не только побегов из почек, но и каллуса и корней из тканей семядолей. Запасы питательных веществ и фитогормоны в семядолях сои способны обеспечить регенерацию побегов при культивировании на среде с низкой концентрацией солей и даже на дистиллированной воде. Свет усиливает пролиферацию каллусной ткани и способствует ризогенезу и регенерации сои *in vitro*.

Развитие R₁ из семян, полученных in vitro. Растения-регенеранты сои СибНИИК 315 в колбах объемом 250 мл, с побегами не более 10 см высотой или даже с розеткой укороченных побегов, способны цвести и плодоносить. Пригодны ли такие семена для размножения?

Мы провели опыт с 36 семенами, полученными от регенерантов R₀ в условиях *in vitro*. Семена поставили на проращивание в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге при температуре 20°C. Через три дня проросли тридцать семян, на шестой день появились еще пять проростков. Таким образом, всхожесть составила 97%. Проростки были посажены в вегетационные сосуды с почвой и культивировались при температуре 15 – 20°C.

Интересный результат дал эксперимент по изучению влияния холода на развитие растений R₁ из семян, полученных *in vitro* (рис. 7). Проросшие семена инкубировали в холодильнике при температуре 2°C в течение 55 часов перед посадкой в почву. По скорости роста «охлажденные» растения значительно опередили контрольную группу, содержащуюся при 20°C: в трехнедельном возрасте их средняя высота составила 22 см, а контрольных – 16 см, в возрасте семи недель – 29 против 22 см.

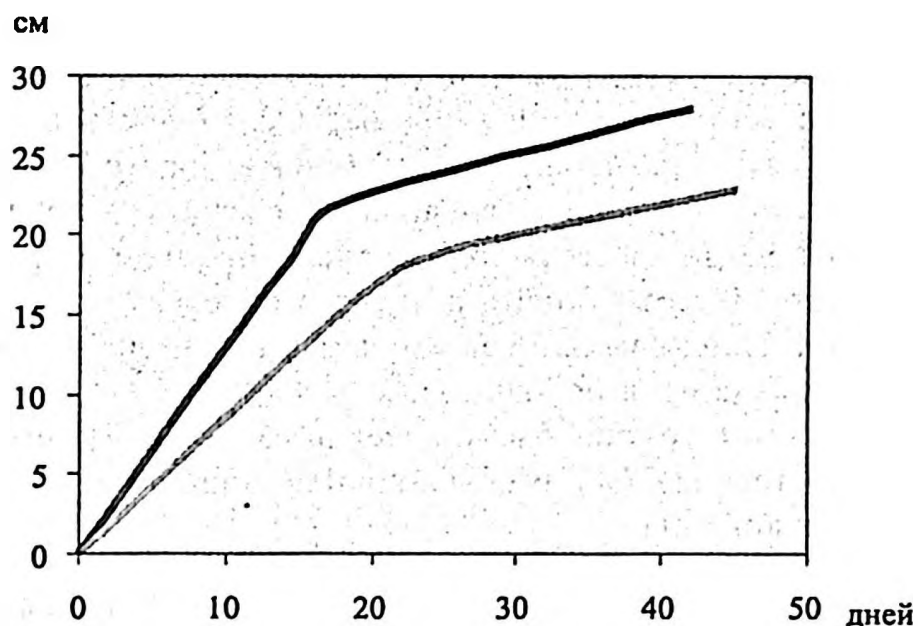


Рис. 7. Влияние обработки холодом на рост проростков R_1 сои

Верхняя линия – опыт (+2°C, 55 ч. перед посадкой);
нижняя линия – контроль (20°C)

У молодых растений R_1 мы обнаружили некоторые морфологические особенности, аномалии и нарушения развития. В таблице 7 показана частота их встречаемости.

Т а б л и ц а 7
Особенности развития сои R_1 из семян, полученных *in vitro*

Признак	Частота встречаемости, %
Отсутствие апекса	3
Отсутствие простых листьев	9
Аномалии строения листьев	15
Аномалии семядольного узла	21
Бесплодие	36

Один всход не имел точки роста побега, что стало причиной его гибели в стадии семядольных листьев. У двух растений отсутствовали примордиальные листья в первом узле, а у третьего имелся лишь один такой лист. Пять растений имели аномалии в строении листьев; семь растений сформировали в семядольных пазухах простые листья или ветви с простыми и двухлисточковыми листьями.

Низкое ветвление в семядольном или примордиальном узле свойственно только малокультурным тонкостебельным разновид-

ностям сои (Енкен, 1959) и не встречается у исходного сорта СибНИИК 315.

Высота растений в фазе четырех настоящих листьев варьировала от 9 до 38 см. Два экземпляра погибли в возрасте 39 и 42 дней с симптомами фузариозного увядания. В возрасте двух месяцев при высоте от 13 до 41 см растения имели простые и тройчатые листья в количестве от 5 до 12, а число стеблевых узлов колебалось от 4 до 8. Плодоносящие экземпляры имели до трех бобов с одним или двумя семенами (табл. 8).

В 1997 г. эти семена были посеяны в полевом питомнике (всхожесть составила 67%), чтобы в конце сезона получить семена следующего поколения.

Т а б л и ц а 8

Развитие потомств первого поколения регенерантов сои
в вегетационных сосудах

№ R ₁	Период до цветения, дней	Период до созревания, дней	Высота, см	Число листьев	Число узлов	Высота размещения нижнего боба, см	Число бобов	Число семян
606 I	52	100	19	5	6	12	1	2
II	-	-	2	0	-	-	-	-
656 I	56	-	33	9	6	-	0	0
II	42	108	33	8	6	5	3	3
657 I	50	93	29	5	4	25	1	2
II	42	93	23	4	4	21	1	1
658 I	50	-	29	8	6	-	0	0
II	44	100	28	7	5	20	1	2
661 I	48	-	37	10	8	-	0	0
II	41	130	35	10	7	26	1	1
662 I	50	104	30	10	6	10	2	2
II	-	-	6	1	-	-	-	-
663 I	50	120	27	8	7	16	1	1
II	50	-	28	7	7	-	0	0
664 I	48	100	27	8	6	25	1	2
II	47	110	18	5	6	17	1	1
665 I	51	120	20	6	6	10	1	1
II	50	-	13	5	-	-	0	0
668 I	44	130	32	8	6	18	1	2
II	42	-	29	7	6	-	0	0
672	45	125	41	12	7	21	1	1

Полевые испытания

Природные условия района исследований. Полевые испытания сомаклонов и мутантов проводились на опытных полях Сибирского НИИ кормов, расположенных близ города Новосибирска в трех километрах от реки Оби. Согласно схеме ботанико-географического районирования, приведенной в работе А.В. Куминовой с коллегами (1963), место проведения исследований расположено у восточной границы дернисто-луговой подзоны в Северном Приобском лесостепном округе. Растительный и почвенный покров испытывают влияние различных форм мезо- и микро-рельефа. Наиболее распространенной формой рельефа является равнина с микропонижениями различных размеров и глубин. Почвенный покров представлен выщелоченными чернозёмами, в значительной мере окультуренными, и тёмно-серыми и серыми лесными почвами под берёзовыми или берёзово-осиновыми лесными массивами и колками. Залесенность составляет около 20%. Зональная растительность – разнотравно-луговые степи и лесостепные луга – почти полностью распахана. Между перелесками сохранились участки остепнённых и настоящих суходольных лугов вторичного происхождения.

Климат резко континентальный, умеренно прохладный, умеренно засушливый, с продолжительной суровой зимой и коротким жарким летом, нередко с весенне-летней засухой и дождливой осенью. Среднесуточная температура самого холодного месяца января $-19 \dots -21^{\circ}\text{C}$, самого теплого месяца июля $17 \dots 21^{\circ}\text{C}$. Среднегодовая сумма осадков составляет на левобережье р. Оби 350 – 400 мм, наибольшее количество выпадает в июле – 72 мм, за период с мая по сентябрь – 280 мм. Преобладает ясная малооблачная погода, в среднем ежегодно в Новосибирске бывает 2028 часов солнечного сияния. Безморозный период длится 110 – 115 дней. Сумма температур воздуха выше 10°C равна $1800 - 1950^{\circ}\text{C}$, средний гидротермический коэффициент $1,2 - 1,0$.

Среднесуточные температуры воздуха и суммы осадков в годы исследований представлены на рисунке 8. Вегетационный сезон 1998 г. по температуре и количеству осадков был близок к норме, 1999 г. был очень засушливым и жарким (гидротермический коэффициент Селянинова ГТК 0,3), а лето 2000 г. отличалось частыми и обильными ливнями (ГТК 2,0). Последующие два

года были сырыми, а 2003 г. – засушливым. Контрастные погодные условия удобны для выяснения экологических особенностей соматклонов и мутантов.

Количественная изменчивость соматклонов сои

В 1998 г. в полевом питомнике изучались 46 растений сои R₂ и R₃ из семян, полученных в полевых и лабораторных условиях. В таблице 9 приведены результаты полевого испытания потомств регенерантов и исходного сорта СибНИИК 315. Потомства регенерантов в среднем превосходили исходный сорт по таким важным признакам, как количество продуктивных узлов, узлов с большим числом бобов, бобов с большим числом семян, количество семян и их масса. Вариабельность соматклонов по большинству признаков значительно превышала уровень фенотипического варьирования исходного сорта.

По комплексу элементов семенной продуктивности (числу продуктивных узлов, бобов, количеству и массе семян) выделились по одному растению из потомков R 656 II, R 663 I, по два растения из R 661, R 808, R 809. Одно растение имело нижние бобы на высоте 23 см, два – 15 см, но продуктивность их была низкой. В следующем году все полученные семена каждого растения были высеяны в поле для изучения и оценки изменчивости.

В условиях жаркого и засушливого лета 1999 г. снизились многие количественные показатели вегетативной и генеративной сферы сои: высота растений, семенная продуктивность и особенно масса семени по сравнению с 1998 г. (табл. 10, см. табл. 9). Содержание белка в семенах также оказалось низким. В то же время увеличение числа продуктивных узлов позволило в какой-то степени компенсировать падение продуктивности.

Анализируя распределение соматклонов относительно исходного сорта по длине вегетационного периода в 1999 г., можно констатировать значительный сдвиг изменчивости в сторону позднеспелости как за счет верхнего лимита, так и по количеству измененных линий (табл. 10, рис. 9 А).

Аналогичная ситуация сложилась и по данным 2000 года: из 79 соматклонов 19 созрели на 4 – 5 дней раньше исходного сорта, а 35 – позже на 4 – 12 дней. Скороспелость присуща исходному генотипу, возможно, поэтому дальнейший сдвиг в сторону ускорения развития менее вероятен, чем в обратную. В распределении

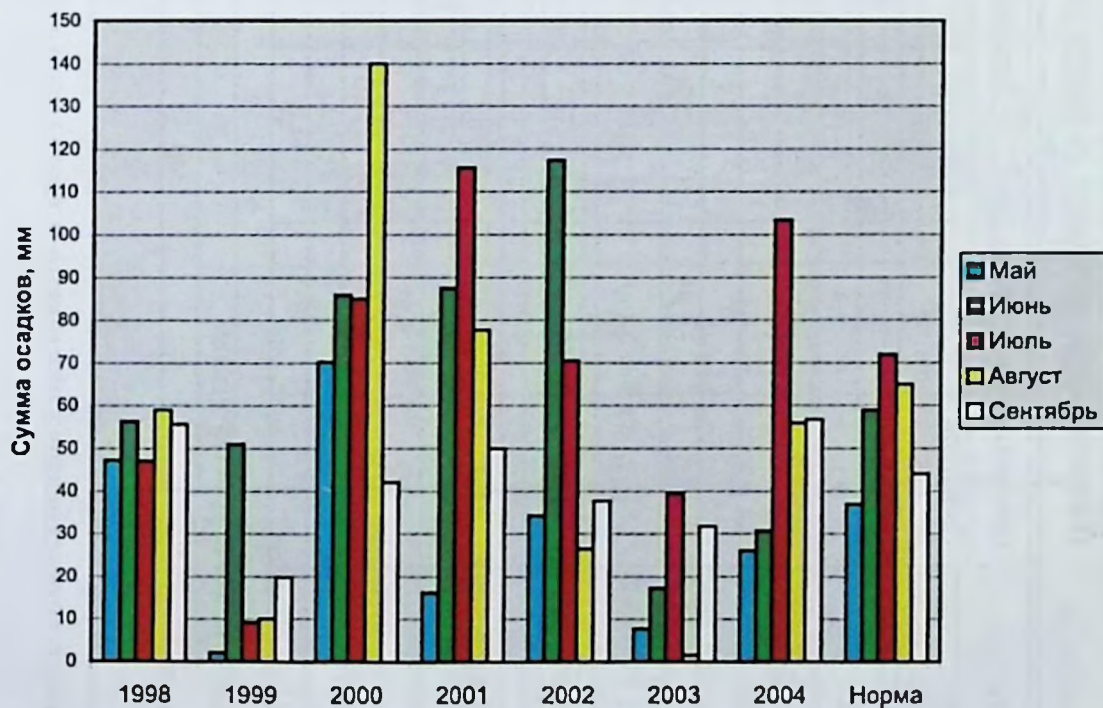
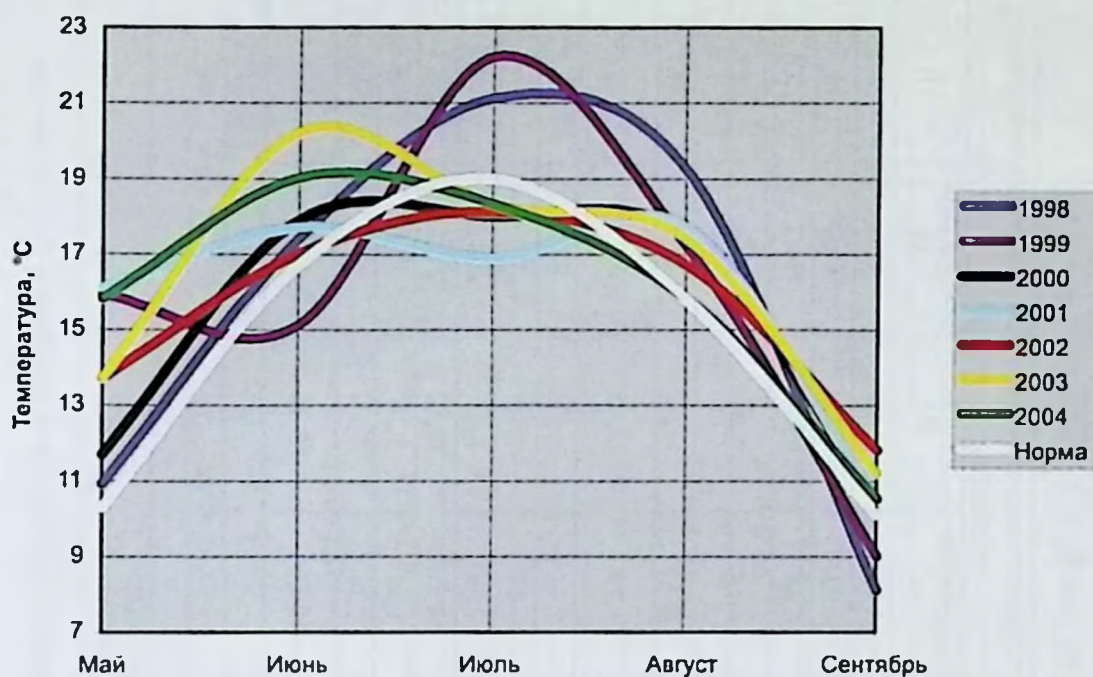


Рис. 8. Среднесуточная температура воздуха и количество осадков в годы полевых исследований (данные ГМС п. Огурцово Новосибирского района Новосибирской области)

Таблица 9

Изменчивость признаков потомств регенерантов сои R₂ и R₃ (1998 г.)

Показатели	Среднее арифметическое		Лимиты		Среднее квадратическое отклонение		Коэффициент вариации, %	
	СибНИИК 315	R	СибНИИК 315	R	СибНИИК 315	R	СибНИИК 315	R
Высота, см	66,9	73,0*	56 – 78	49 – 93	5,73	11,84	8,6	16,2
Число ветвей	4,1	3,4	2 – 6	2 – 8	1,03	1,52	25,4	44,5
Число продуктивных узлов	20,8	30,2*	14 – 36	10 – 49	6,48	10,78	31,2	35,8
Высота размещения нижнего боба, см	8,4	9,0	2 – 16	2 – 23	4,45	3,97	52,8	44,2
Число бобов	49,0	65,8*	19 – 102	12 – 155	23,19	35,61	47,3	54,1
из них:	10,0	15,8*	1 – 7	3 – 24	4,79	10,45	47,9	66,3
1-семянных	22,6	30,2*	5 – 16	1 – 22	8,44	19,70	37,4	65,2
2-семянных	13,4	20,7*	0 – 11	0 – 20	6,17	9,42	46,0	45,6
3-семянных	0,1	1,2*	0 – 10	0 – 22	0,36	1,47	254,2	124,5
4-семянных и более	94,2	141,8*	39 – 183	30 – 316	34,76	71,88	36,9	50,7
Число семян	2,7	4,9*	0 – 5	0 – 22	1,54	5,26	56,8	108,1
из них щуплых	12,6	19,3*	4,7 – 26,0	5,6 – 45,1	5,31	9,95	42,0	51,6
Масса семян, г	134,6	138,4	113,3 – 156,0	104,4 – 157,4	15,34	13,36	11,4	9,7

* - разница достоверна на 5%-м уровне

Таблица 10

Изменчивость хозяйственных признаков и химического состава семян соматклонов и лазерных мутантов сои

Признак	Среднее Лимиты					
	1999 г.			2000 г.		
	Контроль	R ₂ – R ₄	M ₂	Контроль	R ₃ – R ₅	M ₃
Вегетационный период, дней	95,1±0,90	99,9±0,73	96,0±0,77	96,2±1,05	98,3±0,57	98,1±0,92
		94 – 105	94 – 100		91 – 108	92 – 113
Высота растения, см	55,8±0,72	68,9±1,11*	58,9±0,92	68,8±0,92	88,0±2,37*	73,4±1,89
		55,4 – 84,1	50,1 – 67,6		39,9 – 122,4	59,1 – 106,4
Число ветвей I порядка	3,9±0,14	3,9±0,11	4,4±0,09*	3,2±0,11	2,4±0,11	2,6±0,19
		2,8 – 5,2	3,8 – 5,2		0,9 – 4,8	1,6 – 3,7
Высота заложения нижнего боба, см	8,3±0,15	9,7±0,21	8,4±0,17	8,7±0,18	7,0±0,21	7,0±0,19
		7,4 – 11,3	7,1 – 9,9		2,3 – 10,3	2,6 – 10,0
Число продуктивных узлов	25,0±1,07	25,5±0,69	30,4±0,90*	20,7±0,47	19,3±0,42	20,5±0,59
		18,7 – 33,4	21,5 – 36,8		12,1 – 28,8	14,9 – 26,3
Число бобов на 1 растение	44,4±2,27	48,4±1,3	58,3±1,79*	41,5±1,23	38,1±0,98	41,9±1,29
		30,9 – 64,6	35,1 – 78,6		24,2 – 59,8	30,4 – 54,7
Число семян на 1 растение	90,0±4,90	110,2±2,49*	120,0±2,90*	75,9±2,28	72,1±1,76	76,2±1,92
		69,9 – 149,8	68,6 – 156,5		44,5 – 114,0	57,8 – 99,5
Масса семян на 1 растение, г	10,6±0,65	13,0±0,41	14,2±0,50*	14,0±0,45	12,9±0,36	14,2±0,40
		7,9 – 18,2	7,6 – 19,1		7,2 – 21,1	8,4 – 19,0
Масса 1000 семян, г	113,7±1,5	113,7±1,58	114,2±0,99	184,7±1,8	177,3±1,39	180,8±1,20
		101,6 – 135,4	105,0 – 121,6		157,6 – 216,7	147,6 – 209,3
Содержание сырого белка, %	35,7±0,19	35,6±0,37	36,1±0,37	38,4±0,53	39,2±0,48	37,2±0,89
		32,8 – 38,4	33,1 – 38,0		35,8 – 43,6	35,3 – 42,0
Содержание жира, %	20,3±0,10	20,8±0,25	19,9±0,16	19,2±0,14	18,7±0,15	19,0±0,13
		19,5 – 22,0	19,1 – 21,0		17,3 – 19,7	17,8 – 19,8
Содержание сахаров, %	10,1±0,20	10,1±0,21	9,5±0,13	9,9±0,21	10,0±0,25	10,3±0,20
		7,9 – 11,5	8,7 – 10,4		8,0 – 12,8	8,9 – 11,8

*- разница с контролем достоверна на уровне 5%; Контроль (исходный сорт) – СибНИИК 315

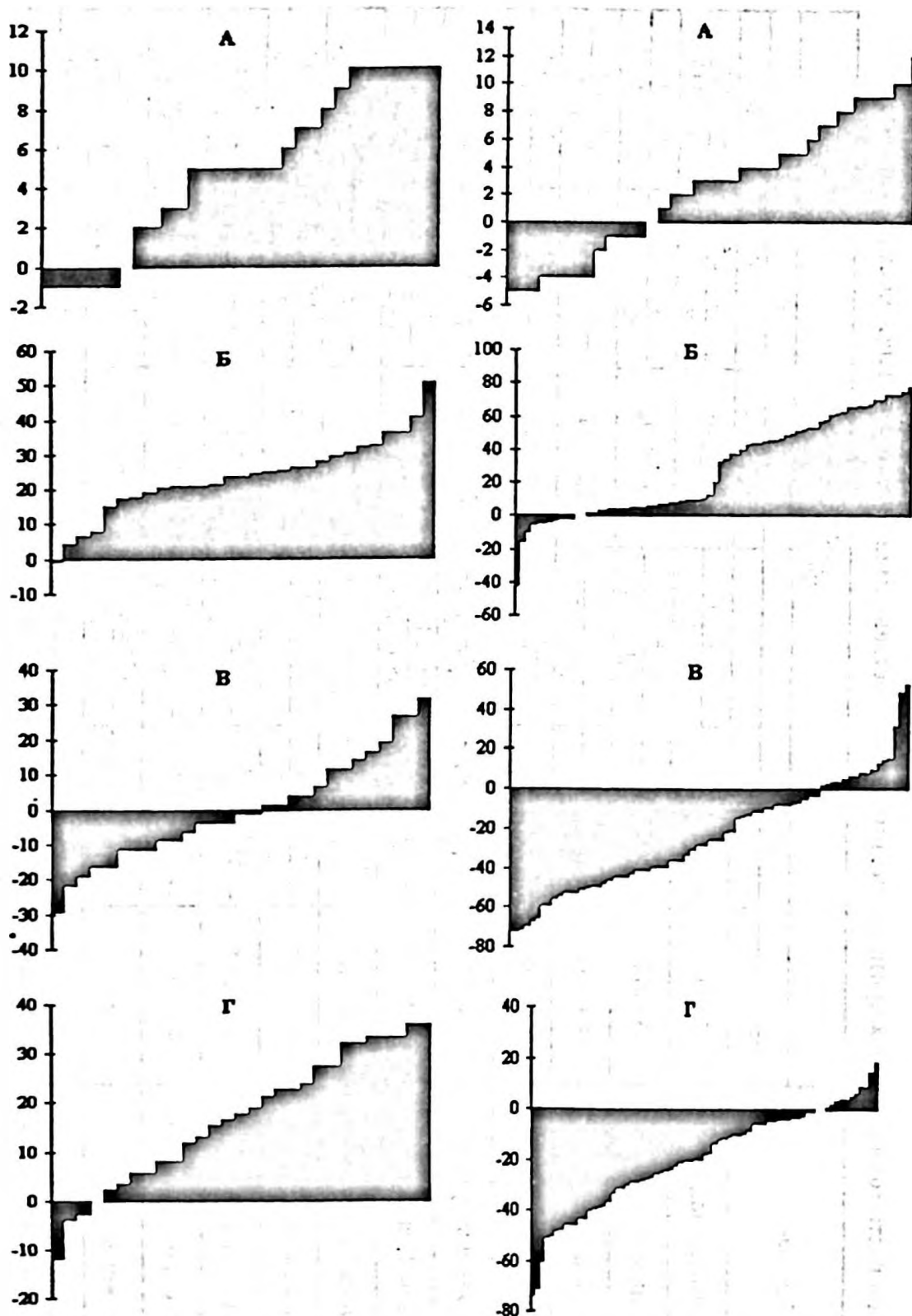


Рис. 9. Изменчивость морфобиологических признаков соматклонов сои (отклонения от уровня исходного сорта, А - вегетационный период, дней.; Б - высота растения, %; В - количество ветвей I порядка, %; Г - высота заложения нижнего боба, %; слева - 1999 г., справа - 2000 г.)

линий по высоте растений наблюдалась значительная асимметрия в сторону увеличения (рис. 9 Б). Большинство соматклонов уменьшили ветвистость по сравнению с исходным сортом (рис. 9 В). Изменчивость по высоте заложения нижнего боба зависела от погодных условий вегетационного сезона: в сухом и жарком 1999 г. подавляющее большинство соматклонов увеличили этот показатель, тогда как во влажном 2000 г. наблюдалась обратная картина (рис. 9 Г).

Изменчивость по элементам семенной продуктивности также продемонстрировала зависимость от гидротермического режима. В 1999 г. большинство соматклонов имели более высокие параметры количества и массы семян, чем исходный сорт, а в 2000 г. лишь каждый третий соматклон был более продуктивным (рис. 10 А-Д).

Среднее содержание питательных веществ в семенах соматклонов изменялось незначительно по сравнению с исходным сортом СибНИИК 315, однако лимиты изменчивости возросли. Если в 1999 г. вариации содержания белка были симметричны по отношению к исходному сорту, то в 2000 г. изменчивость была направлена в основном в сторону повышения (табл. 10, рис. 11 А). По содержанию масла в 1999 г. соматклоны варьировали в основном в сторону повышения, в 2000 г. – в сторону понижения (рис. 11 Б). Изменчивость по содержанию клетчатки и золы также показала зависимость от условий года (рис. 11 В, Г). По содержанию растворимых сахаров в 1999 г. отмечено преимущественное варьирование соматклонов в сторону понижения, в 2000 г. – в сторону повышения. У линий исходного сорта в сыром 2000 г. повысилось содержание белка, снизилось – масла и углеводов по сравнению с засушливым 1999 г. (табл. 10, рис. 11 Д).

В таблице 11 представлена информация о некоторых соматклональных линиях, выделившихся в 2000 г. по различным морфометрическим признакам, в том числе о впервые обнаруженной среди соматклонов карликовой позднеспелой форме сои с округлыми морщинистыми листьями (R 68).

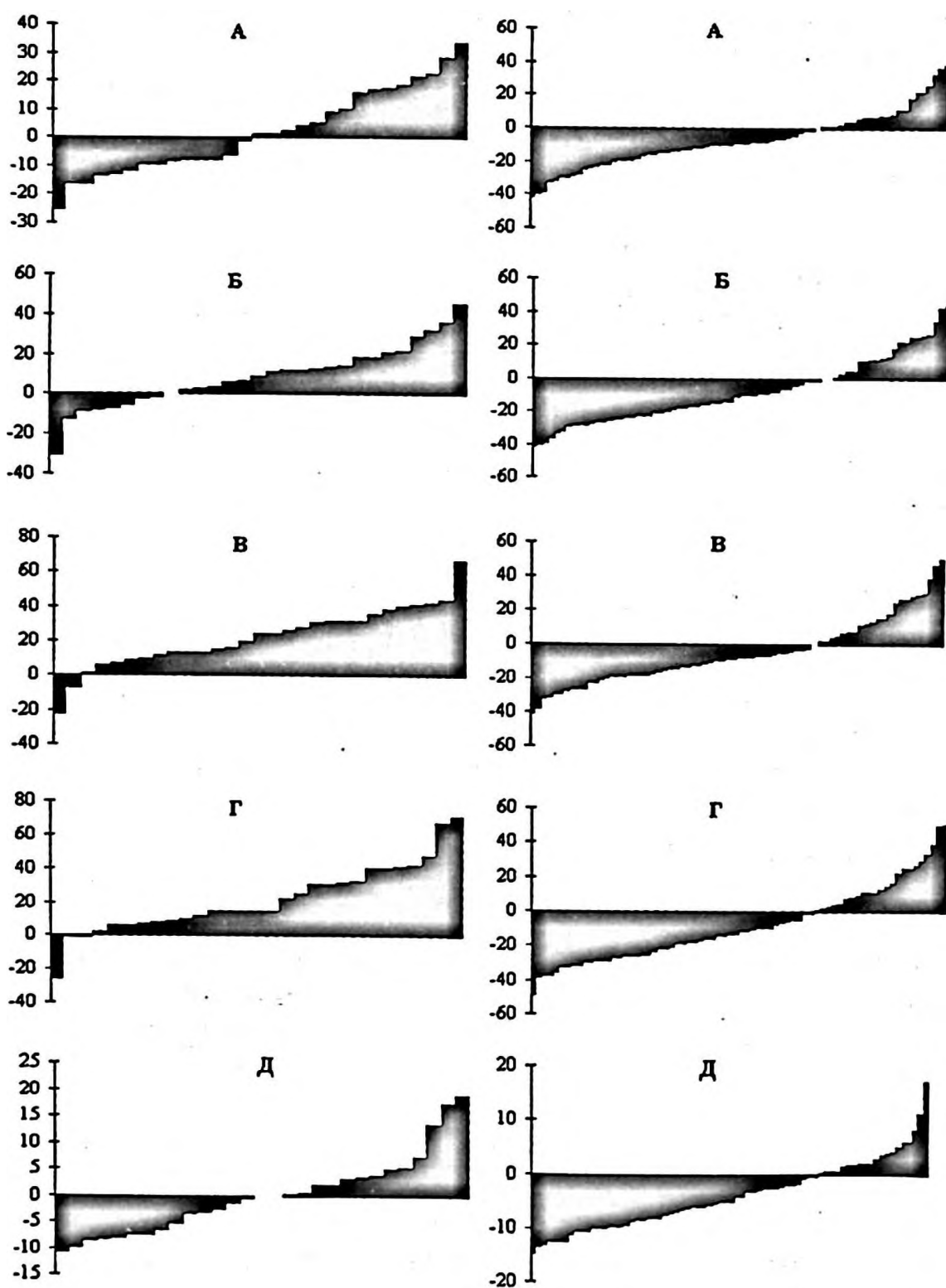


Рис. 10. Изменчивость количественных признаков соматклонов сои

(отклонения от уровня исходного сорта, %: А - число продуктивных узлов на растении, Б - число бобов, В - число семян, Г - масса семян на растении, Д - масса 1000 семян; слева - 1999 г., справа - 2000 г.)

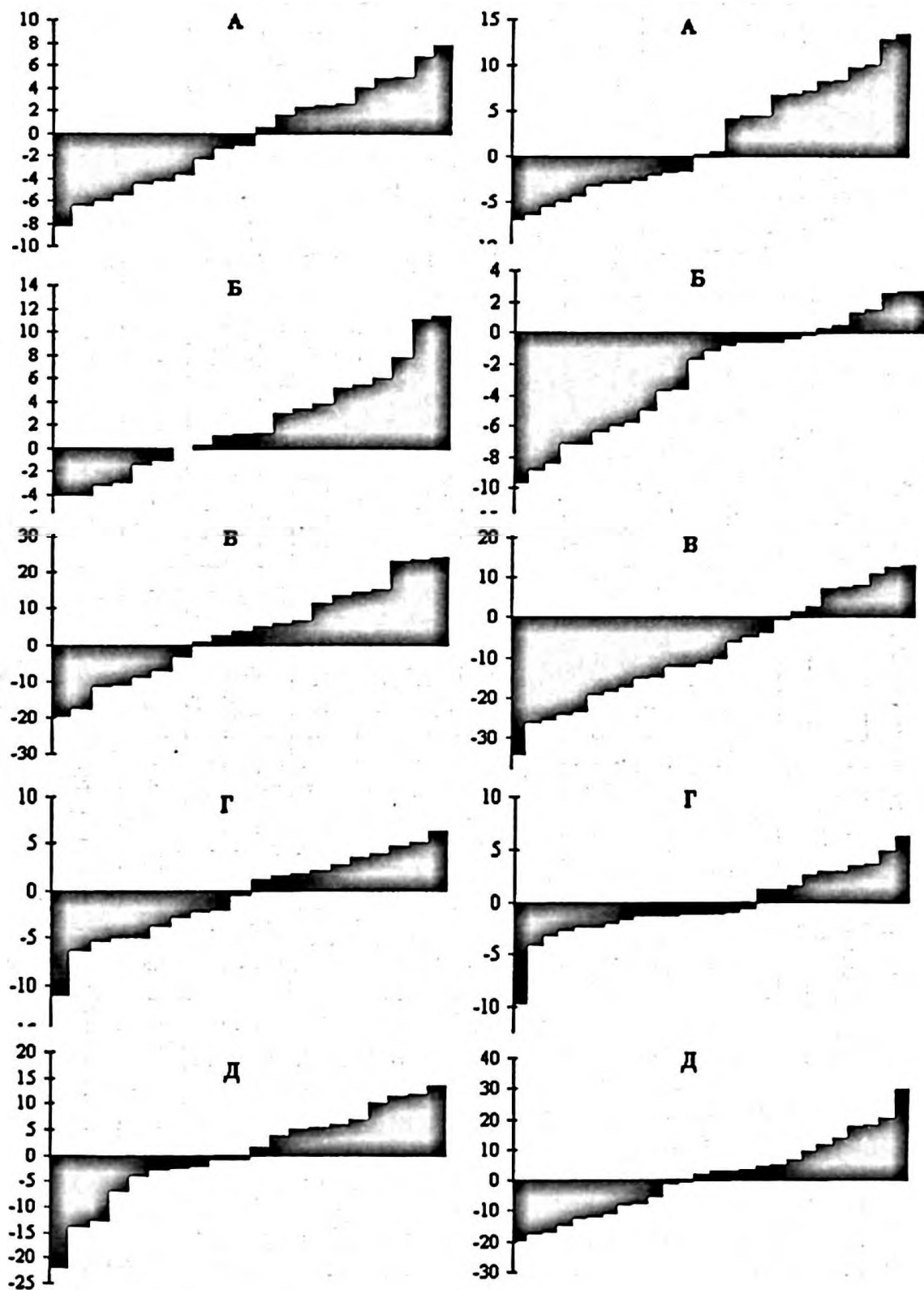


Рис. 11. Изменчивость биохимических признаков семян соматклонов сои

(отклонения от уровня исходного сорта, %: А - сырой протеин, Б - жир, В - клетчатка, Г - зола, Д - сахар; слева - 1999 г., справа - 2000 г.)

Таблица 11

Признаки соматклонов сои R₃–R₅ (2000 г.)

№ линии	Высота, см	Число ветвей I порядка	Высота заложения нижнего боба	Число продуктивных узлов на 1 растении					Число бобов на 1 растении				Число семян на 1 растении	Масса семян на 1 растении, г	Масса 1000 семян, г
				Всего	В том числе				Всего	В том числе					
					с 1 бобом	с 2 бобами	с 3 бобами	с 4 бобами		1-семянных	2-семянных	3-семянных			
R3	71,7	3,5	8,4	25,4*	8,3	10,0*	5,4	1,7	51,8*	15,5*	24,3	11,6*	99,0*	17,6*	178,5
R6	75,1*	3,4	7,5	27,7*	9,2	9,0	6,3*	3,2*	59,6*	16,4*	30,8*	12,0*	114,0*	21,0*	185,2
R7	70,9	2,9	8,4	26,1*	9,6*	9,1	5,4	2,0	52,5*	16,4*	26,9*	9,0	96,2*	17,1*	179,7
R12	84,3*	1,8*	10,5*	12,1*	3,8*	5,3*	1,6*	1,4	24,8*	4,4*	9,5*	10,3	55,2*	11,4	216,7*
R23	72,4	4,2*	8,3	28,9*	10,0*	10,6*	5,6	2,7*	59,2*	17,6*	28,9*	12,2*	111,4*	21,1*	188,5
R25	71,8	3,3	6,9*	28,5*	10,6*	10,8*	4,9	2,3	56,0*	16,5*	28,0*	11,0*	105,5*	19,6*	185,8
R27	73,0	2,8	10,0*	22,1	6,1	9,0	5,2	2,6*	50,7*	15,2*	26,1*	9,5	89,7	16,4	181,1
R29	73,9	3,3	7,7	22,1	4,8*	8,7	6,4*	2,3	51,9*	13,8	27,3*	10,8	96,2*	17,8*	183,7
R34	117,0*	0,9*	4,8*	14,7*	5,8	6,0*	2,4*	0,7	27,4*	6,7*	12,2*	8,5	55,4*	9,6*	174,0
R39	119,0*	1,4*	4,7*	14,1*	5,5	5,9*	2,3*	0,7	26,4*	7,3*	10,5*	8,7	51,9*	8,8*	165,1
R65	76,3*	4,7*	7,8	25,3*	8,6	8,6	5,7	2,4	52,3*	15,3*	26,7*	9,7	97,9*	17,5*	177,0
R68	39,9*	4,8*	6,6*	16,1*	6,4	4,9*	3,7	1,1	31,9*	6,1*	13,6*	12,1*	69,8	14,6	205,8*
R70	73,3	3,4	8,7	22,4	6,0	7,7	9,0*	2,9*	50,6*	12,6	25,8	10,0	94,9*	18,2*	194,4
R71	72,3	3,7	6,9*	22,0	5,5	8,4	5,9*	2,4	49,2	11,0	24,3*	12,9*	98,2	18,8*	187,4
Контроль	68,8	3,2	8,7	20,7	7,2	7,9	4,2	1,4	41,5	11,8	19,8	8,43	75,9	14,0	184,7

Примечания: * различия достоверны на 5%-м уровне; контроль – СибНИИК 315

Эффекты предпосевного облучения семян сои лазером

Влияние предпосевного облучения лазером семян сои исследовали в течение трех лет в полевых опытах (Рожанская и др., 2003). Параметры излучения и методика обработки приведены на странице 46.

Первое поколение M_1 изучалось в условиях вегетационного сезона 1998 г. с температурой и увлажнением, близкими к среднестатистической норме (см. рис. 8). У растений из облученных семян в среднем увеличились на 8 – 10 % масса и число семян с одного растения, ветвистость, число продуктивных узлов и 3-семянных бобов. Заметно уменьшилась вариабельность количественных признаков по сравнению с контрольной группой растений: коэффициенты вариации по высоте, ветвистости, элементам семенной продуктивности снизились в 1,5 – 2 раза. Таким образом, эффект лазерного облучения в первом поколении, в условиях вегетационного сезона 1998 г. с нормальными гидротермическими условиями, проявился в стабилизации модификационной изменчивости при незначительном стимулировании параметров вегетативной и генеративной сферы.

Второе поколение M_2 изучалось в 1999 г., в условиях чрезвычайно засушливого и жаркого вегетационного сезона. Потомства облученных растений в среднем превзошли исходный сорт по числу и массе семян с одного растения на 40 и 37 % соответственно (см. табл. 10). Обнаружена межлинейная и внутрелинейная вариабельность количественных признаков. Итак, предпосевная обработка семян сои излучением лазера во втором поколении стимулировала семенную продуктивность в условиях гидротермического стресса и увеличила фенотипическую изменчивость.

Вегетационный сезон 2000 г., более благоприятный для сои по условиям увлажнения, не выявил достоверных различий средних между опытной популяцией и исходным сортом. Сравнение лимитов изменчивости в популяциях лазерных мутантов M_3 и соматоклонов сои R_3 – R_5 показало более широкий размах вариаций количественных признаков у потомств растений-регенерантов (см. табл. 10).

Между линиями из облученных семян выявлены значительные морфологические и физиологические различия, выделились позднеспелые и высокорослые формы мутантов с более крупными листьями. Из двадцати шести изученных линий пять достоверно отличались высокой семенной продуктивностью (табл. 12), четыре линии имели более крупные семена, семь – созревали раньше исходного сорта на 4 – 6 дней.

Т а б л и ц а 12

Признаки высокопродуктивных лазерных мутантов сои М₃ (2000 г.)

Признаки	СибНИИК 315 (контроль)	Линия №				
		1	3	14	16	25
Вегетационный период, дней	98	100	96	99	92	93
Высота, см	68,8	74,7	74,6	69,4	75,1	78,8*
Высота заложения нижнего боба, см	8,7	6,9*	6,9*	8,4	8,4	7,8
Число продуктивных узлов	20,7	22,4	26,3*	22,9	23,7*	23,4*
Число бобов на 1 растение	41,5	49,5	52,7	50,7*	50,9*	54,7*
Число семян на 1 растение	75,9	88,7	99,5*	91,6	94,7*	93,9*
Масса семян на 1 растение, г	14,0	17,5*	19,0*	18,8*	18,5*	16,3
Масса 1000 семян, г	184,7	196,5*	189,5	191,7	194,2*	168,9*

* - разница с контролем достоверна на 5%-ном уровне

Вычисления коэффициентов корреляции биохимических признаков семян сои показали достоверные различия в зависимости от происхождения линий и гидротермических условий года (табл. 13). Отрицательная корреляция между содержанием белка и жира, слабая у исходного сорта, была стабильно сильной у соматклонов, а у лазерных мутантов слабой в засушливом 1999 г. и сильной в сыром 2000 г. У соматклонов в 2000 г. обнаружена достоверная отрицательная связь между содержанием белка и минеральных веществ. Корреляции между содержанием белка и сахаров отсутствовали у всех популяций в условиях засухи и были отрицательными при избытке влаги. Если в засушливом 1999 г. у исходного сорта достоверно коррелировали масличность и содержание минеральных веществ в семенах, то у соматклонов и лазерных мутантов такая связь отсутствовала, зато в сыром 2000 г. эта корреляция проявилась только среди соматклонов.

Т а б л и ц а 13

Парные коэффициенты корреляций по Пирсону биохимических признаков в популяциях сои разного происхождения

Пары признаков	Происхождение линий					
	СибНИИК315		Сомаклоны		Облучение лазером лазером	
	1999 г.	2000 г.	1999 г.	2000 г.	1999 г.	2000 г.
Белок – жир	-0,41	-0,35	-0,79*	-0,73*	-0,34	-0,63*
Белок – клетчатка	0,07	-0,25	-0,08	-0,29	-0,38	-0,38
Белок – зола	0,10	0,19	-0,24	-0,49*	-0,07	-0,15
Белок – сахар	-0,08	-0,80*	-0,03	-0,52*	0,02	-0,63
Жир – клетчатка	-0,19	0,30	0,02	0,06	-0,31	0,15
Жир – зола	0,58*	0,25	0,22	0,61*	0,06	-0,07
Жир – сахар	0,16	0,47	-0,04	0,55*	0,18	0,68*

* – достоверно на 5%-ном уровне

Изменение структуры корреляций у соматклонов или мутантов по сравнению с исходным сортом свидетельствует о генетических различиях между линиями или внутрелинейной гетерогенности по степени проявления количественных признаков в разных условиях.

Семена лучших растений из высокопродуктивных линий, полученных в результате облучения лазером, были переданы в лабораторию селекции СибНИИ кормов. После трех лет изучения стабильности и наследуемости признаков в селекционных питомниках, в результате отборов выделены два образца, превосходящие исходный сорт СибНИИК 315 по комплексу хозяйственно важных признаков. Они совмещают скороспелость и высокую семенную продуктивность и включены в селекционный процесс создания новых сортов сои.

Изменчивость соматклонов и мутантов сои при отборе на продуктивность

Соматклоны и мутанты сои с повышенной семенной продуктивностью выявлялись и отбирались нами для изучения их перспектив в качестве селекционного материала. Начиная с поколений $R_3 - R_5$ (2000 г.), мы определяли с помощью дисперсионного анализа линии с повышенным количеством и массой семян на растениях и отбирали для посева будущего года наиболее продуктивные экземпляры. В том же году был прове-

ден индивидуальный отбор γ -мутантов на продуктивность в поколении M_2 .

В 2001 г. были испытаны в поле и проанализированы по семнадцати признакам 79 линий соматклонов $R_4 - R_6$ и 56 мутантов в третьем поколении. Из них девятнадцать соматклонов созрели на 4 – 5 дней раньше исходного сорта, тридцать пять – позже на 4 – 12 дней, остальные достигли фазы восковой спелости практически одновременно с исходным сортом СибНИИК 315 (101 ± 3 дня). Среди мутантов более скороспелые формы не обнаружены. В среднем соматклоны отличались пониженной высотой растений (47,8 см), мутанты – повышенной (59,7 см) по сравнению с исходным сортом. Среди соматклонов встречались карликовые формы не выше 40 см. Высокой семенной продуктивностью отличались 7 соматклонов с достоверными различиями более чем по шести признакам (табл. 14), низкопродуктивными были 27 линий. Среди мутантов выделились 11 линий с повышенной массой семян и 10 – с пониженной.

Сравнение количественной изменчивости между группами потомств регенерантов и мутантов сои после отборов обнаружило у тех и других широкий спектр вариаций. В 2002 были испытаны в поле 66 соматклонов поколений $R_4 - R_6$ и 107 мутантов M_4 , отобранных по продуктивности в 2000 и 2001 гг.; в 2003 г. с жарким и засушливым летом испытывались потомства высокопродуктивных образцов 2000 – 2002 гг.: 26 соматклонов $R_5 - R_6$ и 23 мутанта M_5 .

В 2002 г. с дождливым июнем и пониженной температурой июля (см. рис. 8) растения исходного сорта сои созрели в среднем за 100 дней. Вариабельность по длине вегетационного периода у линий регенерантов и мутантов составила 93 – 120 дней; двадцать три линии созрели на 5 – 7 дней раньше исходного сорта, и шестьдесят пять – позже на 6 – 20 дней. В начале цветения (5 июля) средняя высота растений у большинства линий варьировала в пределах 40 – 50 см, у трети – не достигала 40 см, и лишь у немногих превышала 50 см (рис. 12). Позднее размах изменчивости возрос, поскольку детерминантные формы быстро достигали предела роста (50 – 60 см), тогда как растения индетерминантного типа продолжали расти до конца сезона. Многие позднеспелые линии отличались от исходного сорта высоким вьющимся стеблем и более крупными листьями с округлыми пластинками и морщинистой

Т а б л и ц а 14

Характеристики высокопродуктивных линий соматклонов
R₄ – R₆ и мутантов M₃ сои (2001 г.)

Линия	Ве- гетаци- онный пери- од, дней	Высота, см		Число продук- тивных узлов на расте- нии	Число бобов		Число семян		Масса семян на расте- нии, г	Масса 1000 семян, г
		расте- ний	заложе- ния нижне- го боба		в узле	на расте- нии	в бобе	на рас- тении		
<i>Соматклоны</i>										
R 34	110	61,0*	6,9	27,3*	1,90	53,8*	2,20*	118,3*	20,7*	172,5*
R 10	103	54,6	6,8	21,8*	1,97	44,2*	2,16*	98,3*	17,6*	182,8*
R 25	110	59,6*	9,0	21,7*	1,87	41,3*	1,93*	79,8*	17,6*	216,9*
R 35	103	47,1*	6,0*	18,6	2,50*	46,9*	1,66*	75,7*	15,9*	202,8
R 54	99	45,8*	7,0	17,6	2,06	37,7	1,82	69,2*	14,4*	197,0
R 46	111	57,8*	9,0	15,9	1,71*	27,9	2,12*	60,6	14,4*	241,8*
R 16	102	53,5	5,5*	19,5*	1,82	36,0	1,88	66,9	14,3*	212,9
<i>Мутанты</i>										
M 14	101	60,5*	6,3*	26,6*	1,89	49,8*	1,75	87,1*	18,2*	206,1
M 30	98	60,4*	6,7*	22,5*	1,94	43,5*	1,78	76,5*	16,3*	211,2
M 15	100	56,6	7,2	24,6*	1,83	45,2*	1,72	76,8*	16,2*	211,4
M 35	105	77,0*	11,8*	19,1	2,17*	42,1*	1,76	72,1	15,7*	214,7*
M 51	101	49,8	7,9	14,8	2,63*	39,7*	1,84	70,7*	15,3*	218,8*
M 53	98	67,0*	6,7*	16,4	2,29*	37,8	1,64*	61,9	15,2*	222,2*
M 13	102	56,8	7,4	22,0*	1,84	40,8*	1,74	69,2*	15,2*	217,2*
M 44	102	59,6	7,5	24,7*	1,70*	42,7*	1,62*	68,3*	15,2*	221,7*
M 18	103	61,6*	8,3	22,8*	1,74	40,2	1,69	67,0*	14,8*	219,4*
M 45	103	61,8*	8,2	21,4*	1,84	41,1*	1,66*	65,6	14,4*	218,2*
M 25	103	51,5	5,5*	19,1	2,14*	43,1*	1,62*	69,7*	14,3*	205,3
Кон- троль	101	52,7	8,1	16,5	1,88	32,4	1,81	55,5	11,4	204,0

Примечания: * различия достоверны на уровне 10%, контроль - СибНИИК 315

поверхностью (рис. 13), встречались среди них и карликовые формы высотой 34 – 45 см.

Средние арифметические показателей вегетативного развития и продуктивности в 2002 г. не имели достоверных различий между группами линий разного происхождения и с исходным сортом (табл. 15). Однако размах изменчивости различался: у соматклонов был повышен верхний лимит по высоте растений и числу генеративных элементов, у мутантов снижен нижний лимит почти по всем изученным признакам.

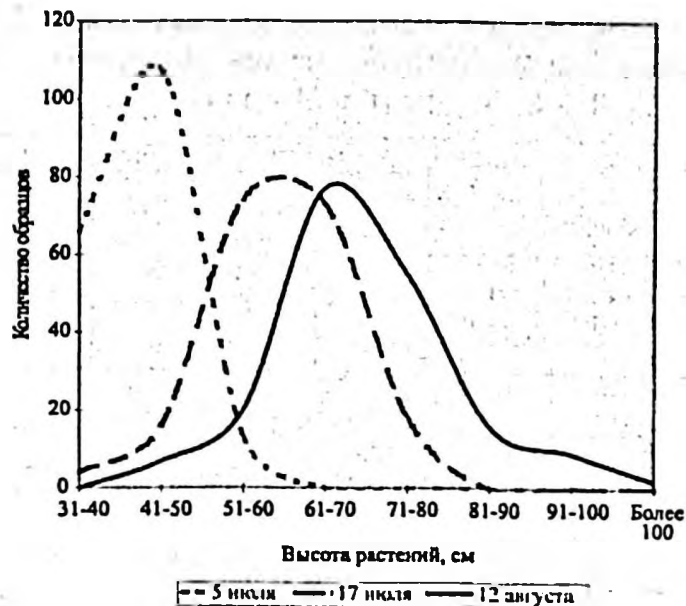


Рис.12. Динамика распределения линий соматклонов и мутантов сои по высоте растений, 2002 г.

Т а б л и ц а 15
Изменчивость между линиями соматклонов и мутантов сои

Признак	2002 г.			2003 г.		
	Среднее Лимиты			Среднее Лимиты		
	Контроль	Соматклоны $R_4 - R_6$	Мутанты M_4	Контроль	Соматклоны $R_5 - R_6$	Мутанты M_5
Вегетационный период, дней	100	<u>103</u> 93 – 119	<u>101</u> 93 – 120	91	<u>93</u> 88 – 105	<u>97</u> 89 – 100
Высота, см	61,3	<u>59,3</u> 34,5–91,4	<u>60,3</u> 34,9–84,4	48,2	<u>60,8*</u> 42,3–93,6	<u>56,5*</u> 35,2–95,2
Высота заложения нижнего боба, см	8,0	<u>8,6</u> 4,4–15,1	<u>8,6</u> 2,8–15,1	8,3	<u>9,8</u> 5,2–15,2	<u>9,1</u> 4,8–17,7
Число продуктивных узлов	18,0	<u>16,8</u> 7,5–28,6	<u>16,4</u> 6,6–25,3	11,1	<u>15,7</u> 11,6–26,0	<u>15,7</u> 11,1–21,3
Число бобов на 1 растение	38,2	<u>32,3</u> 13,5–56,9	<u>35,2</u> 10,0–54,1	30,2	<u>31,3</u> 21,1–51,8	<u>31,5</u> 20,6–43,5
Число семян на 1 растение	67,6	<u>63,6</u> 27,4–109,0	<u>63,0</u> 14,6–99,8	53,6	<u>58,9</u> 34,5–97,6	<u>57,5</u> 34,6–81,5
Масса семян на 1 растение, г	13,1	<u>12,4</u> 5,5–20,0	<u>12,4</u> 2,3–21,5	9,4	<u>9,6</u> 4,8–18,4	<u>10,1</u> 6,4–15,0
Масса 1 семени, мг	192	<u>197</u> 159–249	<u>195</u> 159–244	173	<u>160</u> 120–221	<u>173</u> 147–196

*- разница с контролем достоверна на уровне 0,1%; контроль (исходный сорт) – СибНИИК 315

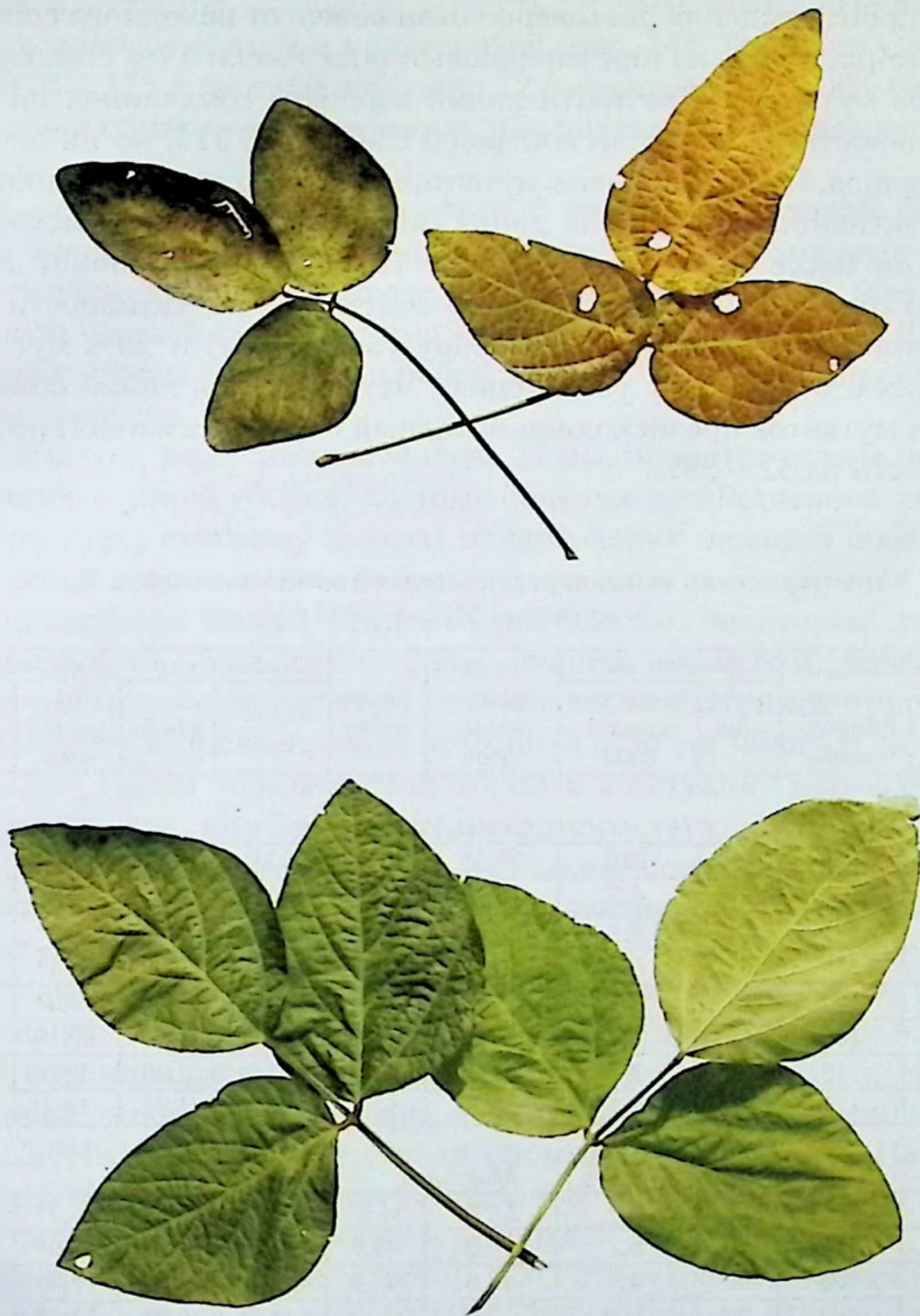


Рис. 13. Изменчивость соматклонов сои по морфологии листа и продолжительности вегетационного периода

Вверху – исходный сорт СибНИИК 315 (фаза созревания),
внизу – R₅ 606 (фаза зеленых бобов).
Листья собраны 24 августа 2002 г.

Немногим менее половины линий соматонального и мутантного происхождения достоверно отличались от исходного сорта по высоте растений, из них карликовый рост имели 17% соматоналов и 15% мутантов. Две трети линий карликов-соматоналов по продуктивности не уступали контролю СибНИИК 315, но ни одна не превзошла. Среди карликов-мутантов половина отличалась низкой продуктивностью, но одна линия (М 76) превосходила исходный сорт по массе семян на 37% (табл. 16). Среди всех линий достоверно отличались от контроля по семенной продуктивности 24% соматоналов (из них 14% в сторону увеличения) и 36% мутантов (из них 6% в сторону увеличения). Четырнадцать линий соматоналов и мутантов превосходили исходный сорт по семенной продуктивности на 32 – 58%.

Т а б л и ц а 1 6

Характеристики высокопродуктивных линий соматоналов R₁ – R₆
и мутантов M₁ сои (2002 г.)

Линия	Вегетационный период, дней	Высота, см		Число продуктивных узлов	Число бобов	Число семян		Масса семян, г	
		растения	заложенная боба			на растение	в бобе	на растение	1000
<i>Соматоналы</i>									
R 8	111	75*	10,2	23,3*	49,0	87,9	1,89	17,9*	211
R 9	103	55*	6,7	23,3*	52,7*	97,3*	1,85	18,9*	192
R 11	97	54*	8,3	25,8*	56,9*	109,0*	1,92	20,0*	179
R 18	99	61	6,8	26,2*	52,9*	94,9*	1,79	18,4*	194
R 40	104	91*	8,5	23,5*	52,3*	108,7	2,09	19,0*	171
R 49	110	60	4,5*	23,7*	49,5	88,5	1,80	19,1*	217
R 22	115	63	9,7	25,6*	46,4	92,6	2,00	18,0	193
R 33	118	77*	4,7	22,8	51,0	96,3	1,88	18,0	187
<i>Мутанты</i>									
M11	97	58	6,3	22,9*	51,9*	92,9*	1,78	19,2*	210
M47	98	60	6,2	20,6	47,9	86,2	1,83	18,0*	298
M53	105	74*	4,5	18,6	43,9	86,4	1,97	18,0*	208
M68	103	70	2,9*	22,5	53,9*	99,8*	1,88	21,5*	215
M6	117	82*	10,5	21,0	40,6	78,7	1,91	18,0*	224*
M76	108	41*	7,8	20,4	43,5	91,3*	2,12	18,6*	207
Контроль	100	64	8,4	18,4	38,2	69,6	1,82	13,6	196

Примечания: * различия достоверны на 5 % уровне; контроль – СибНИИК 315

Исследование архитектуры генеративной сферы соматоклонов и мутантов позволило выявить их дополнительные различия с исходным сортом и между собой (рис. 14). Так, если у сорта СибНИИК 315 в нижнем ярусе (до 12 см) размещалось 8% бобов, то у линий соматоклонов и мутантов этот показатель варьировал от 3 до 17%.

В отличие от исходного сорта с наибольшей долей бобов (29%) в ярусе 13 – 24 см, линия R8 отличалась равномерным распределением бобов по высоте растений, мутант M76 (карлик) большую часть бобов разместил между 13 и 36 см, а линии R40 и M6 выше уровня 60 см несли бобов больше, чем в любом из ниже лежащих ярусов.

Бобы сои, расположенные ниже 12 см, остаются в поле после механизированной уборки, поэтому большое хозяйственное значение придается признаку высоты прикрепления нижнего боба как показателю технологичности сорта.

Однако, как можно видеть из рисунка 14, некоторые из наших образцов с невысоким размещением нижнего боба (R33, R49 и M68) даже за вычетом технически недоступного урожая нижнего яруса превосходили исходный сорт по числу бобов на 21 – 27%. Таким образом, если подойти к ситуации неформально, потеря при комбайнировании одного-двух нижних бобов (как правило, односемянных) с избытком может быть компенсирована повышенной семенной продуктивностью сортов на основе подобных форм сои.

На рисунке 15 представлена фотография растений сои, принадлежащих к разным линиям, которая дает некоторое представление о разнообразии соматоклонов по высоте, ветвистости, архитектонике генеративной сферы и типу роста стебля (исходный сорт СибНИИК 315 имеет стебли промежуточного типа). На рисунке 16 изображены семена соматоклонов, различающиеся по размеру, форме, окраске оболочки и рубчика.

Жарким и засушливым летом 2003 г. длина вегетационного периода исходного сорта СибНИИК 315 составила 91 день, продуктивность его снизилась на 31% по сравнению с 2002 г. Соматоклоны и мутанты вегетировали от 88 до 105 дней. Большинство линий (61% соматоклонов и 48% мутантов) по высоте растений значительно превосходили исходный сорт, по остальным признакам средние арифметические групп разного происхождения не имели

достоверных различий (см. табл. 15). Три соматклона и два мутанта превысили уровень исходного сорта по массе семян с растения, четыре соматклона и пять мутантов – по количеству семян (табл. 17). Кроме засухи, заметное отрицательное влияние на развитие сои оказали агротехнические условия нового опытного участка с более бедными почвами. Очевидно, линии, снизившие продуктивность в 2003 г., оказались недостаточно устойчивыми к засухе в сочетании с эдафическим стрессом.

Т а б л и ц а 17
Характеристики высокопродуктивных линий сои, 2003 г.

Линия	Вегетационный период, дней	Высота, см		Число продуктивных узлов	Число бобов на растении	Число семян		Масса семян, г	
		растения	заложения нижних бобов			на растении	в бобе	на растении	1000
<i>Соматклоны</i>									
R 10	90	62,0*	7,4	20,2*	41,6*	87,5*	2,10	14,2*	159,0
R 14	97	64,9*	5,2*	26,0*	51,8*	97,6*	1,88	18,4*	187,2
R 21	92	71,7*	10,3	20,5*	41,9*	93,1*	2,22	13,4	154,0
R 22	90	69,2*	9,5	18,7*	39,7	84,4*	2,13	13,6*	153,3
<i>Мутанты</i>									
M11	92	54,7*	7,5	21,3*	43,5*	81,5*	1,87	15,0*	184,3
M12	97	71,9*	9,0	14,9*	34,3	72,3*	2,11	12,4	164,0
M14	95	88,3*	10,9*	18,2*	37,2	72,0*	1,94	12,1	161,6*
M15	95	64,9*	8,8	19,7*	37,8	71,6*	1,89	12,3	170,6
M16	92	54,3*	9,9	18,1*	39,4	74,5*	1,89	13,9*	185,9*
Контроль	91	48,2	8,3	11,1	30,2	53,6	1,77	9,4	173,3

Примечания: *различия достоверны на 5 % -м уровне, контроль – СибНИИК 315

Если отбор на продуктивность в условиях лимитирующего фактора является отбором на устойчивость к этому фактору (Драгавцев, 1995), то образцы, отобранные в годы с избыточным увлажнением (2000-2002 гг.), будут устойчивы скорее к повышенной влажности, чем к засухе. Тем не менее некоторые из наших линий остались высокопродуктивными и при дефиците влаги, усугубленном плохими почвенными условиями. Доля соматклонов с повышенной продуктивностью составила 16%, мутантов – 8%. Отсюда следует, что соматклональная изменчивость и мутагенез

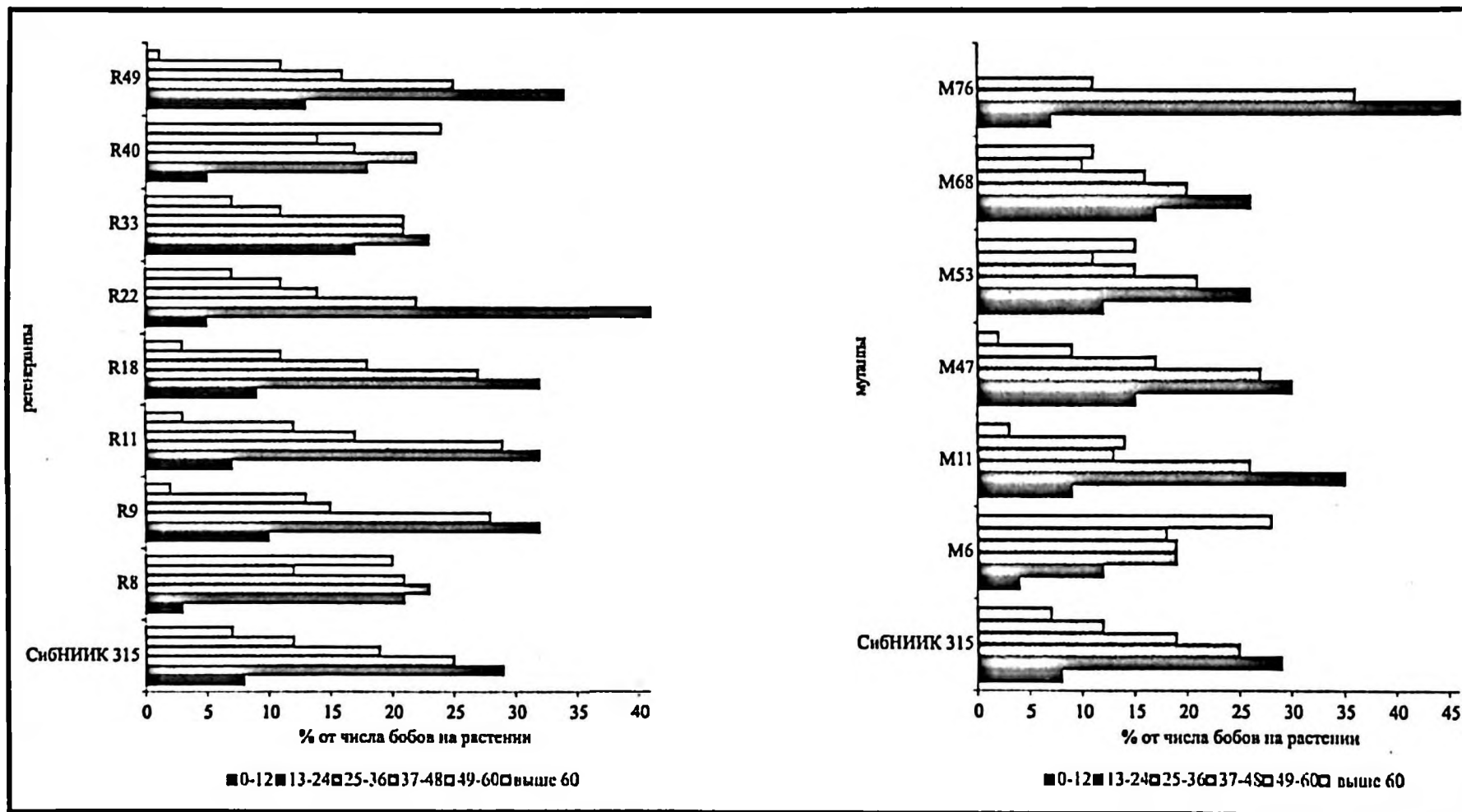


Рис. 14. Размещение бобов по ярусам у высокопродуктивных линий соматклонов (слева) и мутантов (справа) сои. На оси Y изображены линии сои, разделенные на яруса (0 – 12 см, 13 – 24 см, 25 – 36 см, 37 – 48 см, 49 – 60 см, выше 60 см).

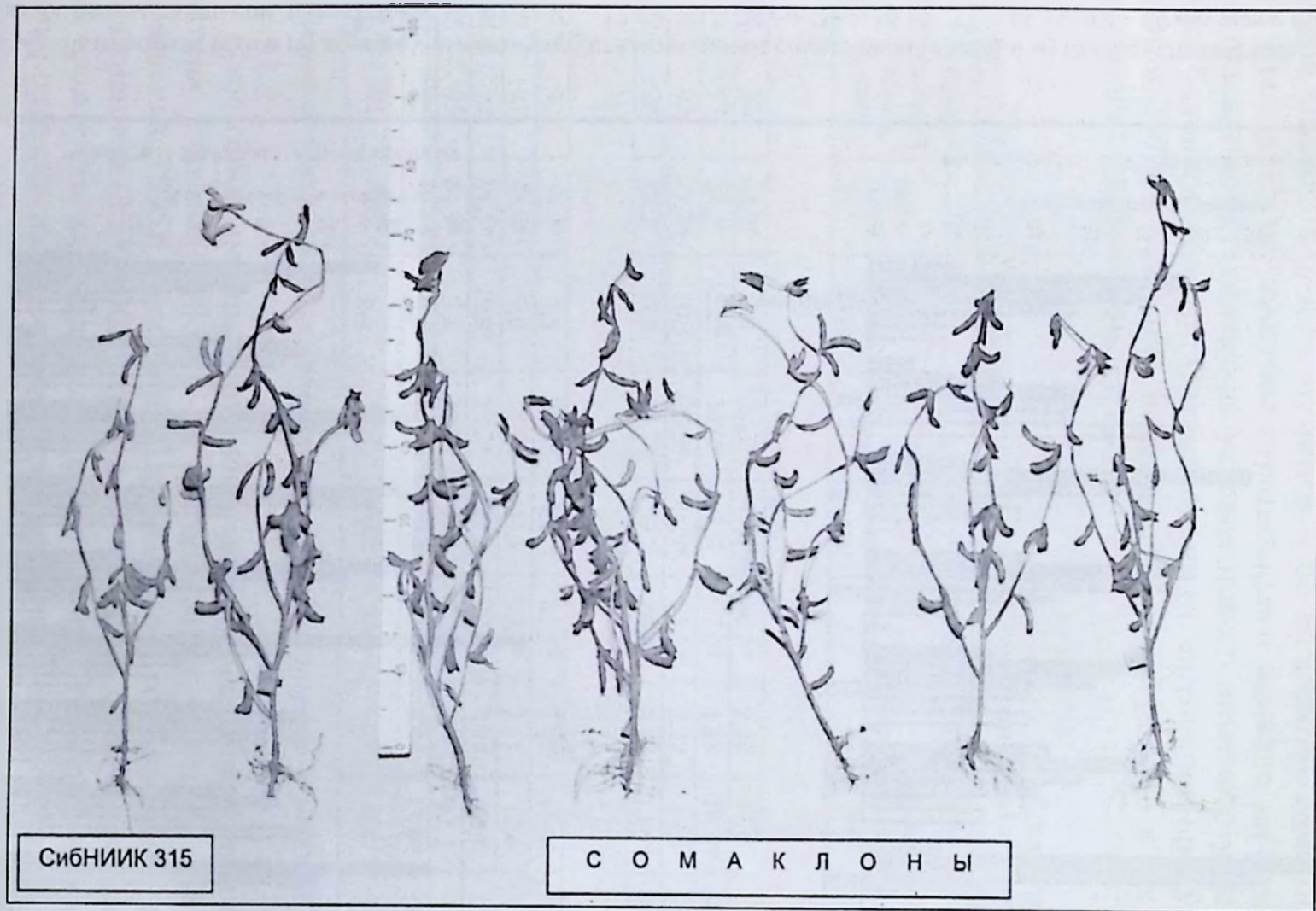


Рис. 15. Изменчивость фенотипа соматклонов сои в III поколении

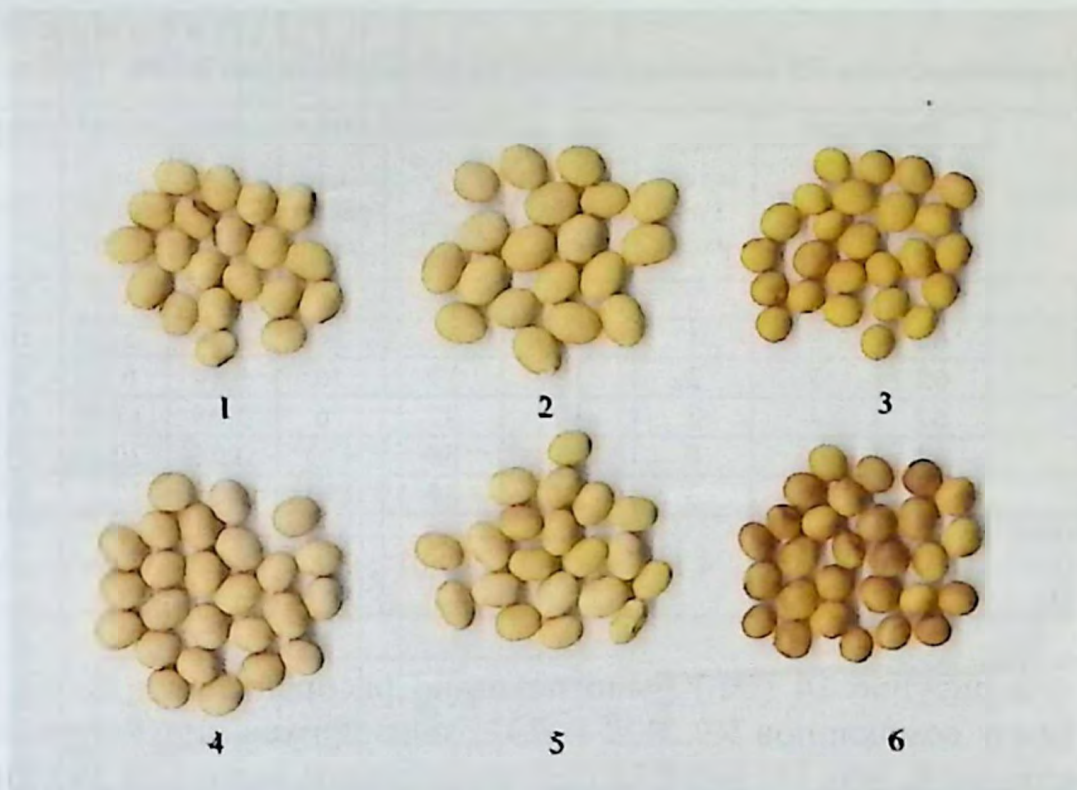


Рис. 16. Изменчивость признаков семян соматклонов сои

(1 – исходный сорт СибНИИК 315, семена желтоватые с темным рубчиком; 2, 4, 5 – крупные семена соматклонов со светлым рубчиком, 3, 6 – мелкие семена двух линий R₇ 606 с желто-коричневой и желто-зеленой окраской оболочки).

способны создавать формы сои с экологически стабильной высокой продуктивностью, причем частота встречаемости таких экологически стабильных линий среди соматклонов вдвое выше, чем среди мутантов.

Нестабильность соматклонов

Нестабильность соматклонов сохраняется на протяжении многих поколений. Рассмотрим изменчивость потомств растения-регенеранта R₀ 606, возникшего в культуре семядольного узла сои СибНИИК 315 в 1996 г. В условиях *in vitro* от него было получено два семени. После проращивания в лабораторных условиях один всход погиб из-за отсутствия апекса, другое семя дало растение R₁ высотой 19 см с пятью листьями и одним двусемянным бобом. Результаты полевого испытания шести растений третьего поколения представлены в таблице 18.

Характеристики III поколения потомств регенеранта сои R 606, 1998 г.

Растение	Высота, см		Число ветвей I порядка	Число продуктивных узлов	Число бобов на растении	Число семян		Масса семян, г	
	растения	заложения нижних бобов				на растении	в бобе	на растении	1000
3-3	58	3	2	17	27	55	2,04	8,0	145
3-4	60	8	4	21	26	54	2,04	5,9	109
3-5	62	7	2	15	19	36	1,89	6,0	167
3-6	67	4	2	19	37	76	2,05	12,0	158
3-7	84	10	8	35	55	123	2,24	20,9	170
3-8	78	7	3	27	57	117	2,05	17,5	150
Контроль СибНИИ-ИК 315	66,9	8,4	4,1	20,8	49,0	94,2	1,92	12,6	135

На рисунке 14 (см.) было показано распределение бобов по ярусам у соматклонов R9, R22 и R33, являющихся линейными потомствами R₅ 606. Из них R22 с вегетационным периодом 115 дней имел в ярусе ниже 12 см только 5% бобов, у скороспелого R9 (103 дня) было 10% бобов в нижнем ярусе, у относительно позднеспелого R33 (118 дней) – 17%. Таковы вариации в пятом поколении по длительности онтогенеза и архитектонике генеративной сферы в условиях 2002 г.

Потомства регенеранта 606, отобранные из линии R22 в пятом поколении, практически стабилизировались по продуктивности в поколении R₆, но продолжали варьировать по другим признакам. Результаты испытания 2003 г. представлены в таблице 19, данные по 2004 г. – в таблицах 20 и 21. Среди потомств регенеранта 606, сохранившихся после отборов, есть линии с индетерминантным и промежуточным типом роста стебля, но в целом они более высокорослые по сравнению с исходным сортом. Соматклоны R₆ 606 имеют повышенное количество семян в бобе, но семена их более мелкие (табл. 19).

У потомств R₇ 606 в 2004 г. были определены морфометрические признаки листа. В фазе плодообразования от каждого образца брали 20 листьев среднего яруса и измеряли длину и ширину их структурных элементов (табл. 21). Черешки листьев большинства соматклонов были более длинными, чем у исходного сорта, листья их были крупнее, за исключением образцов I-21 и II-17, из которых первый отличался узколистностью, а второй имел более

Т а б л и ц а 19

Характеристики поколений R₅ и R₆ потомств регенеранта сои 606 (2003 г.)

Поколение R, № образца	Веgetационный период, дней	Высота, см		Число продуктивных узлов	Число бобов				Число семян		Масса семян, г		
		растения	заложения нижних бобов		на растении	в узле	в ярусе 0 – 12 см	Выше 48 см	на растении	в бобе	на растении	1000	
R ₅	4	95	59,0*	6,6	17,8	34,1	1,92	3,5	5,2*	69,0	2,02	9,7	141*
	13	92	93,5*	12,0*	17,3	33,0	1,91	0,9*	11,2*	62,8	1,90	8,8	136*
	2	90	68,9*	14,5*	16,4	32,5	1,98	0,8*	8,2*	57,3	1,76	8,8	149
R ₆	9	90	62,7*	8,3	17,4	32,7	1,90	3,0	4,9*	67,8	2,07	10,0	146
	10	92	62,0*	7,4	20,2*	41,6*	2,06	4,6	5,9*	87,5*	2,10	14,2*	159
	21	92	71,7*	10,3	20,5*	41,9*	2,04	1,7*	7,5*	83,1*	1,98	13,4*	154
	22	92	59,2*	9,5	18,7*	39,7	2,12	3,6	5,0*	84,4*	2,13	13,6*	153
Контроль	91	48,2	8,3	14,1	30,2	2,14	4,1	1,7	53,6	1,77	9,4	173	
НСР 0,05	-	6,7	2,8	4,5	10,2	-	1,5	3,0	20,8	-	4,0	28	

Примечания: Контроль – СибНИИК 315; * различия достоверны на 5%-м уровне

широкие листочки, чем исходный сорт. Крупнолистные формы также варьировали по форме листочков: от клиновидных (образец I-14) до овально-заостренных (IV-9, IV-18).

Вариации по величине и окраске семян в поколении R₇ 606 можно видеть на рисунке 16, где справа изображены семена урожая 2004 г. от потомств наиболее продуктивного растения из линии R22 2003 г. У всех двадцати исследованных экземпляров были мелкие семена, причем у девятнадцати – желто-коричневой окраски (№ 6), у одного растения – желто-зеленой (№ 3).

Итак, проведенное нами изучение фенотипических признаков семи поколений линейных потомств одного регенеранта сои R₀ 606, полученного из семядольного узла проростка сорта СибНИИК 315, говорит о наличии вариаций количественных признаков, позволяющих проводить отбор селекционного материала. После очередного отбора на продуктивность сохранялась изменчивость по важным хозяйственным признакам: длине вегетационного периода, высоте растений, высоте заложения нижнего боба, устойчивости к болезням.

Т а б л и ц а 2 0

Некоторые признаки потомств VII поколения регенеранта R 606, 2004 г.

Линии	Вегетационный период, дней	Высота, см		Пораженность бактериозом		
		7 июля	26 июля	индекс развития, балл	распространение, %	
R ₇ 606	I-14	110	64	113	1	5
	I-21	100	73	123	1	5
	I-24	110	65	133	0	0
	II-2,3,4	115	46	89	1-2	10-20
	II-12,13,14	100	70	82	0-1	0-10
	II-15,16,17	102	69	120	0-1	0-5
	II-18	116	70	88	0	0
	II-21	109	61	91	0	0
	II-23	110	68	104	0	0
	III-18	103	78	110	1	5
	III-25	103	72	121	0	0
	IV-9	109	58	97	0	0
	IV-18	117	62	110	1	5
	СибНИИК 315	99	52	85	1	5

Т а б л и ц а 2 1

Изменчивость морфометрических признаков листа
у линий R₇ 606 в 2004 г.

Линии	Длина черешка листа, см	Длина среднего листочка, см	Ширина среднего листочка, см	Длина черешочка, см	Отношение длины к ширине среднего листочка
I – 14	14,5±0,97	12,1±0,29*	6,4±0,24	3,5±0,18*	1 : 0,53
I – 21	13,4±1,22	11,0±0,19	5,6±0,28*	2,9±0,11	1 : 0,51
I – 24	15,4±1,17*	11,9±0,42*	6,8±0,25	3,3±0,18*	1 : 0,57
II – 17	14,0±1,18	10,3±0,42	6,2±0,45	2,7±0,21	1 : 0,60
III – 25 ₁	13,9±0,92	11,0±0,46	6,6±0,31	3,0±0,21	1 : 0,60
III – 25 ₂	14,0±0,88	11,3±0,50	6,5±0,30	3,4±0,24*	1 : 0,58
IV – 9	16,4±1,11*	12,0±0,33*	7,5±0,28*	3,3±0,12*	1 : 0,63
IV – 18	18,5±1,06*	12,1±0,47*	7,8±0,33*	3,6±0,19*	1 : 0,64
Среднее	15,0	11,5	6,7	3,2	1:0,58
СибНИИК 315	13,8	11,0	6,4	2,7	1 : 0,59

* различия достоверны на 5%-м уровне

В среднем по всей совокупности соматклонов R 606 после отборов увеличились высота растений и число семян в бобе и уменьшилась масса семени. Многие линии имели достоверные различия с исходным сортом по ветвистости, количеству продуктивных узлов, бобов, семян и значительно превосходили исходный сорт по семенной продуктивности и высоте прикрепления нижнего боба, не уступая ему в скороспелости.

Разнообразие по продолжительности вегетационного периода, с одной стороны, открывает перспективы выделения более скороспелых форм, но с другой стороны такая длительная генетическая нестабильность затягивает селекционный процесс.

Наличие крупных наследственных изменений признаков у потомств регенеранта, полученного из семядольного узла в первом пассаже, говорит о соматклональной изменчивости. Семядольные узлы на ранней стадии развития проростка, по видимому, еще не имеют меристематических тканей, детерминированных к воспроизведению исходного генотипа. Изоляция экспланта на этой стадии нарушает контролирующее влияние организма, приводит к неорганизованной пролиферации ткани и способствует появлению генетических изменений у адвентивных почек, возникающих довольно быстро из тканей семядольных пазух изолированных узлов.

Таким образом, ранние стадии развития проростков сои можно использовать для культивирования семядольных узлов с целью получения соматональных вариаций. Сроки образования меристем пазушных почек сои могут быть установлены путем анатомических исследований.

* * *

Возделывание сои в Сибири способно если не решить, то значительно снизить остроту проблемы дефицита белка в питании людей и домашних животных. Для этого необходимы новые высокоурожайные сорта сои, адаптированные к местному климату и пригодные к широкому распространению.

Наши исследования показали эффективный путь получения с помощью соматональной изменчивости новых форм сои, отличающихся повышенной продуктивностью, скороспелостью, экологической стабильностью, технологичностью и улучшенными показателями качества зерна. Богатый спектр и высокая частота соматональных вариаций по основным хозяйственным признакам при возрастании изменчивости у нескольких поколений соматоналов позволяет вести отбор нужных генотипов для разных условий возделывания и регулировать объемы изучаемого материала в самых широких пределах при ограниченном первоначальном количестве регенерантов R_0 .

Мы убедились, что соматональная изменчивость зависит от характеристик исходного сорта. Как правило, она увеличивает фенотипическое разнообразие путем появления вариаций, распределенных симметрично относительно параметра исходного генотипа, если он ранее не подвергался отбору по данному признаку. Чем успешнее была селекционная работа над исходным сортом в каком-либо направлении, тем меньше частота встречаемости соматональных вариаций, сдвигающих значения признака в том же направлении, и меньше величина сдвига. Поэтому только единичные соматоналы превосходили исходный сорт сои по скороспелости или имели меньшую высоту растений.

Соматональная изменчивость сои содействует появлению доминантных признаков, свойственных ее диким предкам. Так появились формы с мелкими семенами, с длинными, тонкими, выющимися и стелющимися стеблями индетерминантного типа,

резко отличающиеся от исходного сорта с крупными семенами и жесткими неполегающими стеблями промежуточного типа роста.

Предпосевная обработка семян сои СибНИИК 315 в течение 15 минут низкоэнергетическим лазерным излучением с длиной волны 632,8 нм при плотности потока мощности 0,08 мВт/см² снизила модификационную изменчивость в I поколении и стимулировала семенную продуктивность в условиях засухи во II поколении.

Предпосевная обработка семян сои дозой γ -излучения 50 грей вызвала увеличение изменчивости в поколении M₁. Потомства облученных лазером и γ -лучами семян, начиная со второго поколения, показали значительную межлинейную и внутрилинейную изменчивость по важным хозяйственным признакам, что позволило провести отборы и получить новый селекционный материал сои.

Размах количественной изменчивости соматклонов сои в наших опытах превосходил уровень вариаций аналогичного характера у мутантов, полученных в результате обработки сухих семян светом лазера и γ -излучением.

Глава 3

НУТ

Хозяйственное значение и распространение

Нут является второй после сои зерновой бобовой культурой мирового земледелия (Кожевников и др., 1958). Он превосходит другие зернобобовые по устойчивости к засухе и вредителям и возделывается в регионах с жарким и сухим климатом с древнейших времен. Его называют иногда «горохом засушливых стран» (Жуковский, 1971, с. 313). Семена нута содержат до 30 % белка, до 8 % жира, 40 – 60% углеводов (крахмала и сахаров) и используются как пищевой и кормовой продукт.

Нут в целом уступает чечевице и некоторым сортам гороха и фасоли по разваримости семян, но у сортов со светлой окраской семенной оболочки разваримость хорошая: от 78 до 173 минут, тогда как темноокрашенные семена развариваются хуже: за 180 – 290 минут (Мирошниченко, Павлова, 1953).

Зерно нута употребляют в пищу обычно в вареном виде, для приготовления супов, пюре, каш, гарниров, пирожков и национальных блюд. Из жареных семян изготавливают лакомства. Нуттовую муку добавляют в кондитерские и макаронные изделия и в молочные смеси для детей. Проростки и молодые бобы употребляют подобно шпинату, зеленые семена едят как овощи, цветки используют в составе выпечки, сладостей, церемониальных блюд (Altaf, Ahmad, 1990). В народной медицине настой из стеблей и кожуры бобов нута употребляют как средство от камней в почках, от кожных болезней. Вареный нут помогает при старческих запорах, масло нута применяют в лечении грибковых заболеваний кожи, нуттовую муку – в лечении чесотки и рака (Балашов, 1995).

В животноводстве семена нута (цельные, дробленые, в виде муки) употребляют в составе концентрированных кормов, особенно для свиней и птицы. Белковая подкормка в виде смеси муки нута и злаковых культур способствует оздоровлению поголовья животных, повышает яйценоскость кур, настриг шерсти у овец, привесы у крупного и мелкого рогатого скота при стойловом содержании (Ливанов, 1963).

Вегетативные части растений содержат много яблочной и щавелевой кислот и, по мнению специалистов, скотом не поедаются

(Жуковский, 1971) и непригодны в качестве корма (Кожевников и др., 1958; Васякин, 2002). По химическому составу и переваримости зеленая масса нута не уступает чине (Мирошниченко, Павлова, 1953). Исследования Краснокутской селекционной станции показали целесообразность использования зеленой массы нута в фазе налива зерна, когда выделение кислот листьями резко снижается, а кормовое достоинство возрастает за счет бобов. Надземная масса вместе с бобами охотно поедалась свиньями и овцами. В опыте, где овцы паслись на нутовом поле, а контрольная группа на посевах суданки и естественном пастбище, привес увеличился в 2,5 раз, а прирост шерсти вдвое (Ливанов, 1963). Наши наблюдения 2003 – 2004 гг. свидетельствуют о кормовой привлекательности вегетативной массы нута: начиная с июня, молодые побеги настолько основательно поедались зайцами, что потребовалось установить специальное защитное ограждение по периметру посевов.

Нут – высокотехнологичная культура: он не полегает, высоко расположенные бобы при созревании не опадают и не растрескиваются, что дает возможность проводить уборку прямым комбайнированием. Нут засухо- и жароустойчив, не повреждается зерновкой, наносящей большой вред урожаю гороха и фасоли, и другими насекомыми. Как и прочие бобовые культуры, он обогащает почву азотом благодаря деятельности клубеньковых бактерий и служит хорошим предшественником для зерновых культур (Мирошниченко, 1976).

Наибольшие площади нут занимает в странах Индо-Пакистанского субконтинента, Средней Азии и Восточного Закавказья, в Турции, Эфиопии, Тунисе, в странах Средиземноморья, в Мексике и Южной Америке (Altaf, Ahmad, 1990, Fontana et al., 1993) и неуклонно распространяется в более северные регионы. В России нут возделывается на Северном Кавказе, в Татарстане, Башкирии, Нижнем Поволжье (Балашов, 1995). Его продвижению в зоны более гумидного климата препятствуют физиологические особенности: снижение фертильности и устойчивости к грибным патогенам, особенно *Ascochyta rabiei*, при высокой влажности и пониженной температуре воздуха в период оплодотворения и формирования семян.

В степных районах Сибири выращиваются сорта Краснокутский 123 и Приво 1. Большое внимание уделяется разработке технологий возделывания (Анохина, 1999; Садохин, 2002; Яровой,

2004; Бодягин, 2004). В лесостепных районах Сибири нут недостаточно стабилен по урожайности и качеству зерна, поэтому необходимы новые сорта, хорошо адаптированные к местным условиям (Васякин, 1995, 2002).

Происхождение нута

Возделывание нута началось с древнейших времен, о чем говорит его сохранившееся название на санскрите (Мирошниченко, Павлова, 1953). Остатки растения, относящиеся к IV тысячелетию до н. э., были обнаружены при раскопках в Палестине (Жуковский, 1971).

Нут принадлежит к роду *Cicer* L. из семейства бобовых (*Fabaceae* Lindl.), объединяющего около 40 видов однолетних и многолетних трав и многолетних кустарников (Altaf, Ahmad, 1990). Известны 9 однолетних видов, все они имеют одинаковое число хромосом ($2n=16$). В культуре распространен только один вид – *C. arietinum* L., отсутствующий в диком состоянии, хотя культурные формы способны к одичанию. Почти все дикие виды *Cicer* сильно отличаются от культурного нута. Они имеют древне-средиземноморский ареал от Марокко на западе до Гималаев на востоке, в пределах $30 - 41^\circ$ северной широты. Большинство дикорастущих нутов обитают в горах на высоте 1 – 2 тыс. м и выше. Исчезновение дикого *C. arietinum* П.М. Жуковский (1971) объяснял его крайней неустойчивостью к патогенному грибу *Ascochyta*. Родиной нута, по мнению Жуковского, поддержавшего версию Декандоля, является территория между Грецией и Ираном в Юго-Западной Азии, где фактически находится центр рода *Cicer*.

И.В. Сеферова (1994, 2001b), анализируя географическое распространение видов р. *Cicer* и разновидностей *C. arietinum*, отметила строгую приуроченность рода к территории со средиземноморским типом увлажнения и предположила, что р. *Cicer* сформировался во время Альпийского орогенеза, когда возникшие горы преградили путь влажным атлантическим воздушным массам, в результате чего в Средиземноморском бассейне сложился засушливый климат.

Н.И. Вавилов (1966) определил переднеазиатский очаг происхождения культурных растений как вторичный центр происхождения нута, поскольку по направлению от Гималаев к Средиземноморью для этого вида «увеличивается число рецессивных признаков, наблюдается укрупнение семян, плодов» (стр. 218). Вави-

лов считал, что первичный центр происхождения нута расположен на территории индийского и среднеазиатского очагов происхождения культурных растений. Е.Н. Синская (1969) также отмечала увеличение с запада на восток числа разновидностей нута с темноокрашенными, угловатыми мелкими семенами. И.В. Сеферова (1994) полагает, что такое распределение связано со степенью развития культуры земледелия: если в Средиземноморье возделывали урожайные сорта с крупными белыми семенами, то в Индии и Восточной Африке выращивали смесь мелкосемянных разновидностей на низком агрофоне; переходную зону представляет азиатский регион. Таким образом, в Индии находится рефугиум исходного разнообразия, но не центр видообразования.

Систематика и морфология

Cicer arietinum L. (*Cicer grossum* Salisb.; *C. sativum* Schkuhr.; *C. physodes* Rchb.; *Vicia arietina* E. Krause; *Cicer sintenisii* Hausskn.; *C. odessanum* Bornm.) – нут культурный, нут рогообразный, chickpea, gram, channa, chhola. Народные названия: бараний горох, азиатский горох, пузырьник, персидский горох, сахарный горох, нагут, нухат и др. (Жуковский, 1971; Ванифатьев, 1981; Altaf, Ahmad, 1990; Балашов, 1995).

Нут представляет собой однолетнее железистоопушенное растение, светло- или сизо-зеленое (рис. 17). Стебли прямые, коленчатые или лежачие, 25 – 75 см длиной, ветвящиеся. Корень стержневой, разветвленный. Семядоли при прорастании семян остаются в почве. Лист с коротким черешком, непарноперистый. Листочков в листе 11 – 17, форма их эллиптическая или обратнойцевидная, край мелкопильчато-зубчатый (рис. 18).

Цветки одиночные, редко по два на цветоносе, мелкие, окраска венчика белая, розовая, красно-фиолетовая, редко желто-зеленая, голубая; окраска цветков коррелирует с окраской семян. Бобы вздутые, ромбические, овальные или удлинённые, 1,4 – 3,5 см длиной, 1-, 2-, реже 3-семянные. Семена с клювиком, по форме угловатые (похожие на голову барана), более округлые (похожие на голову совы) или круглые, гороховидные (см. рис. 1). Поверхность их бугорчатая, морщинистая, шероховатая, гладкая. Окраска семенной кожуры белая, розовая, желтая, коричневая, темно-красная, черная. Семядоли желтые (Павлова, Генералов, 1949; Мирошниченко, Павлова, 1953).

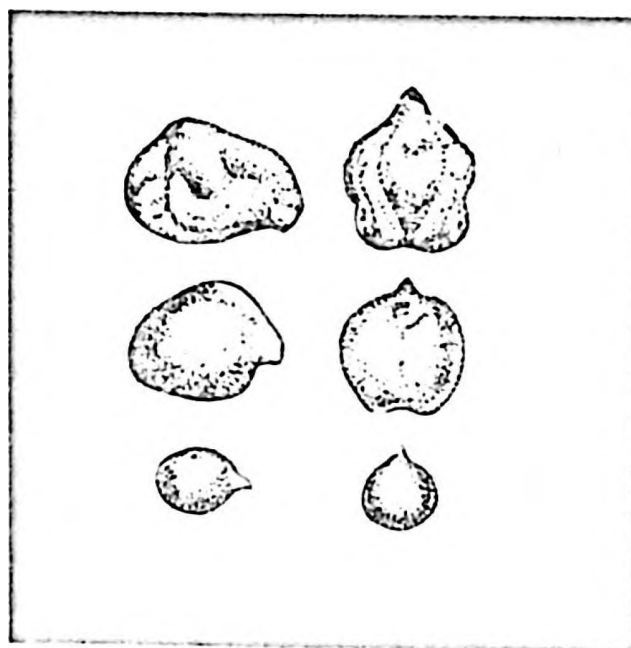


Рис. 17. Растение нуга (вверху) и семена разной формы (внизу)



Рис. 18. Нут *in vivo* (ветвь с листьями и зелеными бобами) и *in vitro* (растение-регенерант, готовое к высадке в почву).

Все формы культурного нута зарубежные исследователи объединяют в две расы, или группы: *microsperma* и *macrosperma* (мелкосемянные и крупnoseмянные), эквивалентные типам *desi* и *kabuli* (Moreno, Cubero, 1978; Hatwin, Singh, 1980).

Внутривидовая классификация вида *C. arietinum* проведена Г.М. Поповой на основании изучения обширной коллекции ВИР, охватывающей практически все мировое разнообразие нута. Вид включает 4 подвида, 13 экологических групп, 22 разновидности.

Ssp. orientale G. Pop. Растения очень мелколистные, семена очень мелкие, 0,6 – 0,7 см длиной, масса 1000 семян 100 – 120 г, различной окраски. Растет в Индии, Пакистане, на Памире, в Эфиопии, Египте. Восточный подвид включает индийскую, иранскую, эфиопскую, памирскую и горную группы.

Ssp. asiaticum G. Pop. Семена мелкие, масса 1000 семян 100 – 120 г, округлые, шероховатые, с клювиком, окраска белая или розоватая, редко коричневая (черных нет). Растет в Средней Азии, Афганистане, Западном Китае, Иране, в восточной части Малой Азии. Азиатский подвид включает туркестанскую, кашгарскую, афганскую группы.

Ssp. mediterraneum G. Pop. Листья крупные. Семена наиболее крупные, масса 1000 семян более 350 г, бледноокрашенные, округлые, с клювиком, небугорчатые. Бобы крупные, вздутые. Растет в странах Западного Средиземноморья и в приэгейской части Малой Азии, включает испанскую группу.

Ssp. eurasiaticum G. Pop. Растения высокорослые. Семена средней крупности (масса 1000 семян 200 – 300 г), округлой формы, с клювиком, бугорчатых очень мало; окраска семян бледная. Растет в Сирии, Израиле, Закавказье, на Украине. Евроазиатский подвид включает турецкую, палестинскую, средневропейскую (закавказскую) и южноевропейскую (богемскую) группы. К двум последним принадлежит большинство отечественных сортов.

Разновидности нута определяют по признакам семян (Сеферова, 1994): форме (угловатой, округлой, округло-угловатой, шаровидной) и окраске семенной оболочки (черной, темно-коричневой, светло-коричневой, рыжеватой, телесно-розовой, белой, зеленой).

Онтогенез и экологические особенности

Нут – яровое растение длинного дня, замедляющее развитие при коротком фотопериоде (Ливанов, 1963). Вегетационный период длится от 60 до 120 дней, в зависимости от сорта и погодных условий. К температуре в первой половине вегетации нут нетребо-

вателен, семена начинают прорастать при 2 – 5° тепла, оптимальная температура прорастания 16 – 18°C. Всходы весной и взрослые растения осенью переносят заморозки до –8°C, однако в период цветения и плодообразования растение нуждается в тепле (оптимальная температура 20 – 25 °C) и страдает от повышенного увлажнения во второй половине вегетации (Павлова, Генералов, 1949; Мирошниченко, Павлова, 1953; Васякин, 2002).

Нут – строгий самоопылитель, ему присуща бутонная автогамия контактного типа, когда оплодотворение осуществляется в бутоне путем непосредственного контакта рыльца и пыльников (Malik et al., 1982; Malhotra, Singh, 1986; Вишнякова, 2003; 2004). Высокая степень самоопыления у нута обеспечивается тем, что только определенные сосочковые клетки рыльца специализируются к приему пыльцы до наступления полного цветения. Трудности искусственной гибридизации могут быть связаны с распределением времени восприимчивости рыльца и ограниченным числом клеток – рецепторов пыльцы. Функциональная специализация клеток рыльца может таким образом быть ответственной за автогамную природу нута (Turano et al., 1983). Известны случаи спонтанного перекрестного опыления, но частота их даже при обилии опылителей в экспериментах индийских ученых не превышала 2% (Nikenejad, Khosh-Khui, 1972).

Высокая влажность и пониженная температура препятствуют опылению и прорастанию пыльцы (Туркова, Ахундова, 1995; Балашов, 1995). При температуре ниже 20°C приостанавливается развитие семени. Неоплодотворенные бутоны и недоразвитые бобы опадают, но цветение продолжается на новых формирующихся побегах, при этом удлиняется вегетационный период. По данным Е.В. Турковой и В.А. Ахундовой (1991), изучавших 40 образцов из коллекции ВИР, в условиях Кубани (зона неустойчивого увлажнения) доля цветков, опадающих на V – X этапах органогенеза, составляла от 17 до 86%, а в условиях аридного климата Узбекистана опадали лишь отдельные цветки. В Сибири при дождливой второй половине сезона вегетация нута затягивается вплоть до октября и прекращается с морозами, а в сухие годы дружное созревание семян происходит в конце августа.

Засухоустойчивость и жаростойкость нута обеспечиваются комплексом морфологических и физиологических адаптаций, присущих растениям степного экотипа – гемиксерофитам. Имея мощную корневую систему, проникающую на глубину до 140 см, и

небольшую листовую поверхность, он хорошо переносит почвенную и воздушную засуху. Водный стресс вызывает увеличение числа листочков в листе при уменьшении общей листовой поверхности и массы листьев (Gupta et al., 1995). Для нута характерна высокая интенсивность транспирации, защищающая ткани от перегрева, и способность прочно связывать воду, обеспечивающая устойчивость к завяданию. Среди бобовых культур нут выделяется солевыносливостью, уступая только чине (Асалиев, Серов, 1973; Корнилов и др., 1982).

К почвам нут довольно требователен. Лучшими для него являются черноземы, каштановые, бурые почвы легкого и среднего механического состава, пригодны и солонцеватые почвы. Реакция почвенного раствора должна быть нейтральной или слабощелочной; на кислых и заболоченных почвах сеять не следует (Боднар, Лавриненко, 1977; Буянова, 1989). Нут хорошо отзывается на минеральные удобрения, особенно фосфорные (Кожевников и др., 1958), и в благоприятных условиях способен дать свыше 3 т/га семян. Как и у других бобовых растений, на корнях нута обитают азотфиксирующие клубеньковые бактерии, что делает его хорошим предшественником для зерновых культур (Мирошниченко, 1976).

Развитие нута подчинено известным корреляциям признаков. Вегетационный период положительно связан с урожайностью семян, но не повсеместно: в зонах с неустойчивым увлажнением иногда определяется отрицательная корреляция, что означает успешное завершение вегетации скороспелыми сортами и опоздание позднеспелых. Скороспелые формы лучше используют осенне-зимние запасы влаги (Балашов, 1995). По сведениям индийских ученых, вегетационный период до цветения прямо коррелирует с урожайностью семян, числом бобов, водным и осмотическим потенциалом листьев. Урожай зерна достоверно связан с числом листьев, бобов и семян на растении, массой 1000 семян, содержанием хлорофилла (Chaudhary et al., 1992; Sathe et al., 1993; Rajoli et al., 1997). Наиболее изменчивыми признаками нута являются: индекс урожайности, биологический урожай, семенная продуктивность 1 растения, масса 1000 семян (Yaday et al., 2003).

По данным Е.В. Турковой и В.А. Ахундовой (1991), потенциальная продуктивность нута прямо связана с числом сформировавшихся побегов: коэффициент корреляции на Кубани достигал 0,74, в Узбекистане 0,97. Теснота связи зависит от климата: в ус-

ловиях неустойчивого увлажнения Кубани часть цветков опадала, поэтому не все фертильные побеги смогли внести свой вклад в продуктивность нута.

Биохимические признаки

Семена нута богаты питательными веществами. Они содержат 18 – 30% белка, 4 – 8% жира, 48 – 56% безазотистых экстрактивных веществ (крахмал, сахар и др.), 3,5 – 5% клетчатки, 2,8 – 3,7% золы, витамины А, В₁, В₂, В₆, С, РР (Павлова, Генералов, 1949; Мирошниченко, 1976; Балашов, 1995). Основная часть белков семени нута представлена глобулинами. По сведениям Государственной комиссии по сортоиспытанию сельскохозяйственных культур, содержание белка в семенах и пределы варьирования зависят от района возделывания нута (Боднар, Лавриненко, 1977):

Россия: Центрально-черноземный район	– 17,6 (14,9 – 18,8) %
Поволжье	– 20,3 (12,0 – 30,7) %
Северный Кавказ	– 23,8 (14,4 – 32,7) %
Урал (Оренбургская область)	– 22,8 (14,1 – 29,1) %
Украина: восточная лесостепь	– 19,3 (15,2 – 27,1) %
степь	– 22,6 (16,6 – 29,5) %
Молдова	– 20,2 (14,6 – 27,3) %
Закавказье	– 22,7 (14,9 – 28,3) %
Казахстан: восточные области	– 21,5 (13,3 – 31,7) %
Средняя Азия	– 23,8 (19,1 – 29,9) %

Содержание в белке важнейших аминокислот, по данным М.И. Смирновой-Иконниковой (1962), колеблется в следующих пределах (%): аргинина 9,5 – 12,5, гистидина 1,6 – 3,1, лизина 2,2 – 6,1, метионина 1,6 – 2,2, тирозина 1,5 – 2,9, триптофана 0,8 – 1,1. Из всех незаменимых аминокислот метионин более других лимитирует биологическую ценность белка зерновых бобовых, и наиболее высоким содержанием его отличаются нут и вигна (Иванов, 1972).

Углеводы семян состоят в основном из крахмала и небольших количеств сахаров, пектиновых веществ и гемицеллюлоз. Жир нута, содержащий 43% линолевой, 22% олеиновой и 10% насыщенных жирных кислот, относится к полувывсыхающим маслам. Кроме того, семена нута содержат более 2% фосфатидов (лецитина и др.), что значительно повышает их питательную ценность.

Минеральный состав семян нута очень благоприятен в пищевом отношении. В составе минеральных элементов более 90% занимают фосфор, калий, магний и кальций, причем содержание

магния значительно выше, чем у других зернобобовых культур. Мелкосемянные формы имеют преимущество как источник легкоусвояемого кальция, поскольку его концентрация отрицательно коррелирует с массой семени (Abbo et al., 2000).

Болезни и вредители

Посевы нута во всем мире поражаются тремя основными болезнями: аскохитозом (gram blight), фузариозом (chickpea wilt) и мелколистностью (smalling of leaves). Самое вредоносное заболевание – аскохитоз, возбудителем которого является гриб *Ascochyta rabiei*. Растение покрывается бурыми пятнами разного размера, затем частично или полностью засыхает. После дождей иногда целые поля выглядят, как после пожара. Семена в пораженных бобах не образуются или остаются мелкими, щуплыми, с низкой всхожестью. Вторая по вредоносности болезнь – вилт, или увядание, когда корни поражаются патогенным комплексом грибов, в основном *Fusarium oxysporum*. В результате разрушения сосудистой системы растение увядает и засыхает. Третье заболевание – мелколистность – характеризуется приостановкой роста, уменьшенными размерами вегетативных органов, отсутствием бобов. Причина его неизвестна, но болезнь хорошо контролируется генетически (Altaf, Ahmad, 1990).

Нут отличается от других бобовых высокой устойчивостью к насекомым-вредителям. По-видимому, железистое опушение, покрывающее всю поверхность растения, играет защитную роль. Мы убедились в неуязвимости нута для гусениц лугового мотылька, когда в 1999 г. произошла вспышка численности этого вредителя, нанесшего большой вред урожаю сои, картофеля и других культур. При этом было замечено, что соседние с нутом делянки сои повреждались гусеницами лугового мотылька гораздо сильнее, чем расположенные в отдалении, поскольку принимали на себя насекомых, не сумевших отложить яйца на растениях нута с железистым опушением. В южных регионах в фазе формирования бобов нут повреждается точильщиком *Heliothis armigera* (Vyas et al., 1983).

В степи заметный вред посевам нута наносят суслики (Ванифатьев, 1981). На наших опытных участках верхушки побегов нута повреждались зайцами. Для защиты от зайцев по периметру питомника ставили ограждение: на высоте 40 – 50 см натягивали

шпагат с прикрепленными к нему верхним концом ленточками из пластика длиной 15 – 20 см, которые под действием ветра раскачивались и шелестели, отпугивая вредителей.

Направления и методы селекции

Основные направления селекции нута для Западной Сибири – создание высокоурожайных сортов, устойчивых к аскохитозу и фузариозу (Васякин, 2002). Сорта нута для Западной Сибири должны иметь вегетационный период от посева до созревания 90 – 105 дней в степных районах, 110 – 115 дней в лесостепных; урожайность 1,5 – 2,0 т/га; содержание в семенах белка 20 – 30%, жира 5 – 8%. Для возделывания в лесостепи необходимо обеспечить толерантность нута к пониженным летним температурам и повышенной влажности в период цветения и формирования семян. Поскольку родина нута характеризуется средиземноморским климатом с жарким и сухим летом, сибирским селекционерам вряд ли имеет смысл искать нужный генетический материал в центре происхождения рода *Cicer*, у произрастающих там диких видов нута. Для создания новых признаков более пригодны индуцированный мутагенез и соматональная изменчивость.

Межвидовая гибридизация нута применяется зарубежными и отечественными селекционерами (Witter et al., 2000; Булынцев, 2001; Croser et al., 2003). Дикий *Cicer reticulatum* легко скрещивается с культурным видом и поэтому считается его предком. Другой вид, способный скрещиваться с *C. arietinum* – это *C. echinospermum* (Ladizinsky, Adler, 1976 a,b). Поскольку *C. reticulatum* устойчив к аскохитозу, гибридизация предназначается для передачи устойчивости культурным сортам (van der Maesen et al., 1980). Устойчивость к аскохитозу имеется и у других диких нутов: *C. bijugum*, *C. pinnatifidum*, *C. judaicum* (Nene, Haware, 1980; van der Maesen et al., 1980; Singh et al., 1981); а устойчивость к вилту обнаружена у *C. judaicum* (Nene, Haware, 1980), но эти виды не скрещиваются с *C. arietinum*. Большие надежды возлагаются на методы клеточной селекции и генной инженерии в плане переноса устойчивости к основным заболеваниям в генотип культурного нута.

Традиционным и наиболее распространенным способом получения селекционного материала благодаря чрезвычайному полиморфизму вида *C. arietinum* является внутривидовая гибридизация (Филатов, 1998; Сичкар, Бушулян, 2000; Nimbalkar, Harer, 2001;

Безуглая, Кобызова, 2001; Германцева, 2001; Булынец, 2003). За рубежом важной селекционной стратегией является интрогрессивная гибридизация между группами *microsperma* и *macrosperma* (Byth et al., 1980).

Селекция нута производится методами педигри, массового отбора, беккрасса и множественного скрещивания (Altaf, Ahmad, 1990). Однако в случаях более сложного наследования и необходимости изучения расщепляющихся поколений требуются слишком большие объемы популяций, и очень редко можно получить желаемое сочетание двух признаков в ранних поколениях. В таких случаях более пригоден индуцированный мутагенез, особенно если один из желательных признаков имеется у хорошо адаптированного высокоурожайного местного сорта. В Пакистане значительно возросли площади под нутом после выведения устойчивого к *Ascochyta rabiei* и высокопродуктивного сорта CM72, полученного путем облучения γ -лучами в дозе 15 крад местного высокоурожайного, но неустойчивого к *A. rabiei* сорта (Haq, Hassan, 1980). По мнению Н.А. van Rheenen с коллегами (1993), нут очень тяжело поддается генетическому улучшению, но обработка семян ЭМС в концентрации 0,1% в течение 4 часов или облучение γ -лучами в дозе 30 – 45 крад дает в M_2 большой спектр качественной и количественной изменчивости. Индуцированный мутагенез применяется и для создания дополнительных генных маркеров (Gaur, Gaur, 2003).

Отечественные сорта нута создавались методами индивидуального и массового отбора из местных сортов, гибридных комбинаций, спонтанных гибридов (Мирошниченко, 1976; Васякин, 2002; Гос. реестр..., 2004).

Развитие методов культуры тканей нута

Биотехнология нута разработана зарубежными специалистами для местных сортов. Особенно активно развивают это направление ученые Пакистана и Индии, в экономике которых нут занимает важное место.

Первые работы по культуре тканей нута были проведены в 1970-х годах. Образование каллуса на стеблевых и корневых эксплантах происходило в присутствии ауксина 2,4-Д (Hosel et al., 1972, 1977, 1978; Muhle et al., 1976; Burmeister, Hosel, 1980). В 1974 г. O.L. Gamborg с коллегами сообщили о делении клеток в культуре протопластов листового происхождения (Gamborg et al., 1974). В 1979 г. появилась инфор-

мация о морфогенезе в культуре тканей нута после криосохранения на среде MS: стеблевые апексы в присутствии 2 мг/л ИУК формировали целые растения, а при замене ее на 2,4-Д дали каллус (Важай, 1979b). В том же году опубликованы сообщения о побегообразовании и ризогенезе в культуре апикальных меристем (Важай, Dhanju, 1979) и образовании каллуса из семядолей (Gosal, Bajaj, 1979). В дальнейшем при культивировании нута были получены побеги из стеблевых меристем (Kantha et al., 1981), каллус и корни в культуре гипокотилей (Singh et al., 1982), корни в культуре апикальных и субапикальных стеблевых эксплантов (Devis, Foster, 1982), растения из стеблевых меристем (Важай, 1983), клеточная суспензия из стеблевой ткани (Sinha et al., 1983). Семядольные узлы на среде с 2,4-Д и кинетином давали каллус, а в присутствии НУК – стеблевые почки и корни (Khan, Chosh, 1984). N. Altaf и M.S. Ahmad получали целые растения в культуре семядольных узлов и стеблевых апексов, каллус и корни из семян, апексов, молодых листьев, стеблей, семядольных узлов, корней, пыльников (Altaf, Ahmad, 1986 a,b). A. Neelam с коллегами (1986 a, в) сообщили о развитии побегов из гипокотилей и стеблевых апексов, образовании каллуса и корней в культуре семядолей. Y.P.S. Bajaj и S.S. Gosal получили многоклеточную пыльцу и эмбриониды в культуре пыльников (Bajaj, Gosal, 1987; Gosal, Bajaj, 1988).

Исследования N. Altaf и M.S. Ahmad показали, что для культивирования тканей нута вполне применимы основные среды MS и B5, а фитогормоны чаще всего действуют следующим образом: БАП способствует росту побегов, ИУК, НУК и ИМК стимулируют рост корней, а 2,4-Д пригодна для длительной пролиферации клеток. Росту каллуса, полученного на среде MS в присутствии БАП (5 мг/л) и гиббереллина (0,5 мг/л), способствовали добавки следующих веществ: зеатина (5 мг/л), экстракта проростков нута (70%), экстракта семядолей нута (70%), кокосового молока (10 – 15%), меда (2 г/л), картофельного экстракта (15 – 20%). Так же хорошо каллусная ткань пролиферировала на среде MS с экстрактом зеленых семян (50%) или с добавкой пролина, глутамина, цистеина, глицина в концентрации 1 мг/л. Из цитокининов наилучшее действие на каллусообразование оказывал зеатин (2 – 5 мг/л), вторым был БАП (5 – 6 мг/л), кинетин и 2-ip действовали хуже. Определено, что 25 – 30-кратное превышение концентрации цитокинина над ауксином является оптимальным для роста каллуса нута. Наилучшей комбинацией гормонов была следую-

щая: БАП 5 мг/л + НУК 0,1 мг/л + 2,4-Д 0,1 мг/л. Облучение каллуса нута γ -лучами в дозе 5 крад увеличивало массу ткани. После изучения большого набора сортов сделано заключение, что генотипы с высокой урожайностью более отзывчивы на введение в культуру *in vitro*, а белосемянные сорта растут хуже темnoseмянных (Altaf, Ahmad, 1986 а; в; 1990).

В восьмидесятые годы XX века техника *in vitro* стала восприниматься как потенциальный источник селекционного материала. Для нута это означало возможность создания устойчивых к аскохитозу и фузариозу форм методами клеточной селекции и генной инженерии, поэтому большие усилия прилагались для разработки способов регенерации растений из активно пролиферирующих каллусных тканей и клеточных суспензий.

R. Islam с коллегами (Пакистан) всесторонне исследовали методические проблемы культуры тканей нута для трансформации посредством *Agrobacterium tumefaciens* и *A. rhizogenes*. Разрабатывая способы клонального размножения нута и регенерации из эксплантов гипокотилей, они установили, что среда MS дает лучшие результаты, чем B5, а оптимальной гормональной комбинацией явилось сочетание БАП с ИУК или НУК. Ими также отмечено, что различные генотипы нута по-разному реагируют на различные комбинации и концентрации фитогормонов (Islam, Riazuddin, 1992; Islam et al., 1993; 1995; 1998).

Итальянские специалисты разработали методику генетической трансформации нута с помощью *A. tumefaciens*, обеспечив массовую регенерацию побегов из осей зрелых зародышей без апикальной меристемы (Fontana et al., 1993).

Соматические зародыши нута были получены на среде MS с добавкой 3 мг/л ауксина 2,4,5-Т (Sagare et al., 1995). Эмбриогенный каллус формировался из незрелых семядолей и незрелых зародышевых осей, инкубируемых при 25°C в течении 60 дней при 16-часовом фотопериоде. Прямой органогенез и регенерацию побегов нута в культуре незрелых семядолей индуцировали L. George и S. Eapen из Индии (1999) с помощью тидиазулона. Изучая два местных сорта нута, R.H. Sarker и S.T. Awal из Бангладеш (1999) установили сортовые различия сред для регенерации из каллуса, при одинаковом составе сред для прямой регенерации из семядольных узлов. S. Huda с коллегами сообщили о регенерации растений из каллуса, полученного в темноте из эксплантов междоузлий и семядолей (Huda et al., 1999; 2003).

Многие исследователи отмечали большие различия требований к составу сред и условиям культивирования у разных сортов и разновидностей нута.

Характеристика исходных сортов

Для введения в культуру *in vitro* в качестве исходного сорта использовался Краснокутский 123, районированный в Западной Сибири. Он выведен на Краснокутской селекционной станции путем отбора из гибридной комбинации сорта Совхозный 14 и образца к-1417. Высота растений 40 – 70 см, кусты прямостоячие, цветки красно-фиолетовые. Семена угловатые (в виде бараньей головы), морщинистые, красно-коричневые и бурые. Масса 1000 семян 280 – 315 г. Содержание белка 21 – 25%. Сорт среднеспелый, созревает за 95 – 110 дней в Кулундинской степи Алтайского края, высокоурожайный (до 3,2 т/га семян), используется преимущественно на корм, устойчив к засухам и суховеям, но сильно поражается болезнями и плохо созревает в условиях сырой осени (Васякин, 2002).

По данным лаборатории селекции СибНИИ кормов, на опытном поле близ Новосибирска (лесостепь) сорт созревает за 118 дней от даты посева, в годы с избыточным увлажнением сильно поражается аскохитозом, полегает из-за чрезмерного роста, затягивает цветение.

Позднее нами был введен в культуру *in vitro* сорт Волгоградский 10, включенный в Государственный реестр с 1990 г. Он входит в число семи ценных по качеству российских сортов нута, имеет светлоокрашенные семена, среднеспелый, устойчив к аскохитозу и фузариозу (Государственный реестр..., 2004). При работе с ним потребовались радикальные изменения методики культивирования, разработанной ранее для Краснокутского 123, что говорит о значительных генетических различиях между сортами.

Морфогенез нута *in vitro*

Асептические растения нута получали из семян после поверхностной дезинфекции. Режим стерилизации должен соответствовать специфике генотипа и особенностям строения семенной оболочки. Семена темносемянного нута Краснокутский 123 с толстой и прочной оболочкой промывали в мыльном растворе, затем помещали на 1 минуту в 70%-й этиловый спирт, после чего дезинфицировали в 10%-м растворе хлорамина Б 20 – 30 мин. Для светлосемянного сорта Вол-

гоградский 10 длительность контакта с активными средами пришлось сократить вдвое, иначе семена теряли всхожесть.

Тщательно промыв автоклавированной водой, асептические семена проращивали в стерильных чашках Петри или пробирках с минимальной средой. Экспланты из тканей 3 – 7-дневных проростков помещали на агаризованные питательные среды В5 или MS с добавлением ауксинов и цитокининов. Культуры инкубировали при температуре 18 – 24°C, 16-часовом фотопериоде и дополнительной освещенности 3 тыс. лк. Результаты наших опытов частично опубликованы (Рожанская, 2002b).

Образование каллуса на эксплантах из тканей проростков происходило в присутствии ауксинов, цитокининов и их сочетаний (табл. 22). Ауксин 2,4-Д способствовал увеличению объема каллуса (табл. 23). Первичный каллус желтовато-зеленого цвета рыхлой консистенции формировался медленно по срезам и за 2 – 3 недели достигал объема до 40 мм³ на свету и до 300 мм³ в темноте. Однако пассированная каллусная ткань активнее пролиферировала на свету.

Регенерация побегов происходила в присутствии цитокинина БАП в культуре тканей семядольного узла, причем особенно активно в темноте (см. табл. 22, 23). Ткани экспланта семядольного узла сильно увеличивались в объеме, особенно в зоне контакта с питательной средой, приобретали светло-зеленый цвет и через 2 – 3 недели формировали слабо дифференцированные побеги с утолщенными стеблями и неразвернутыми листьями (рис. 19).

Растения-регенеранты были также получены в культуре измельченных тканей зрелого зародыша (табл. 22, 24). Морфогенез в культуре тканей зародыша происходил путем образования адвентивных побегов, корней и каллусной ткани (см. рис. 19). В таблице 24 представлена динамика развития регенерантов в течение шести недель на двух разных средах. Оптимальным вариантом мы считаем использование среды Гамборга В5 половинной концентрации с добавкой кинетина в количестве 0,25 – 0,5 мг/л по причине экономичности и достаточно высокой частоты регенерации: в течение месяца на каждом экспланте формировалось в среднем около двух побегов высотой от 1 до 4 см, с 2 – 3 листьями. При дальнейшем культивировании регенеранты активно развивались, но часть из них погибала, поэтому не следует затягивать с пересадкой сформировавшихся побегов на новую среду.

Т а б л и ц а 2 2

Влияние состава среды на морфогенез в культуре тканей нута
Краснокутский 123

Среда с добавками, мг/л	Эксплант	Частота образования, %		
		калуса	корней	побегов
1/2 B5 + БАП 0,5	Измельченный зародыш	8	50	65
	Семядоля	56	6	0
	Семядольный узел	0	0	67
MS + БАП 1	Почка	0	0	88
MS + БАП 4	Измельченный зародыш	67	0	50
	Почка	0	0	100
MS + 2,4,5-Т 3	Семядоля	58	0	0
	Семядольный узел	50	0	0
MS + НУК 8	Измельченный зародыш	100	50	0
1/2 MS + БАП 3 + НУК 0,04	Семядоля	64	0	0
	Семядольный узел	58	0	53

Т а б л и ц а 2 3

Влияние света на морфогенез в культуре тканей нута
Краснокутский 123

Среда с добавками, мг/л	Эксплант	Частота образования, %			Объ- ем кал- луса, мм ³	Количество на 1 эксплант	
		кал- луса	кор- ней	побе- гов		кор- ней	побе- гов
MS + БАП 1	Семядо- ля	<u>86</u> 100	<u>29</u> 33	<u>0</u> 0	<u>6</u> 9	<u>1,0</u> 2,5*	<u>0</u> 0
	Гипоко- тиль	<u>100</u> 100	<u>50</u> 50	<u>0</u> 0	<u>7</u> 6	<u>3,0</u> 2,0	<u>0</u> 0
MS + БАП 4	Семя- дольный узел	<u>80</u> 83	<u>20</u> 0*	<u>60</u> 67	<u>12</u> 60*	<u>1,0</u> 0	<u>2,0</u> 3,4*
B5 + кинетин 1 + 2,4-Д 0,3	Семядо- ля	<u>100</u> 100	<u>19</u> 27	<u>0</u> 7	<u>39</u> 107*	<u>1,3</u> 3,3*	<u>0</u> 1,0
	Гипоко- тиль	<u>100</u> 100	<u>0</u> 0	<u>0</u> 0	<u>35</u> 267*	<u>0</u> 0	<u>0</u> 0
MS /витамины B5 + БАП 0,5 +2,4-Д 0,1	Каллус	<u>80</u> 80	<u>0</u> 0	<u>0</u> 0	<u>920</u> 570*	<u>0</u> 0	<u>0</u> 0

Примечание. Числитель — на свету, знаменатель — в темноте;

*разница по фактору света достоверна на 5%-м уровне



Рис. 19. Регенерация нута в культуре измельченного зародыша (вверху) и семядольного узла (внизу)

Т а б л и ц а 24

Динамика морфогенеза в культуре измельченных зародышей нута
Краснокутский 123

Признак	1/2 В 5 + кинетин 0,5 мг/л			MS + НУК 8 мг/л		
	2 недели	4 недели	6 недель	2 недели	4 недели	6 недель
Число побегов на эксплант	1,1	1,8	1,7	0,7	0,8	1,0
Высота побегов, см	1,5	2,0	3,4	0,1	0,1	0,1
Частота ризогенеза, %	0	50	60	0	50	50
Число корней на эксплант	0	0,9	1,0	0	3,0	4,0
Длина корней, см	0	2	4,4	0	0,5	0,5
Число листьев на побег	0,5	2,7	4,4	0	0	0
Частота каллусогенеза, %	0	8	8	100	100	100

Среда MS с добавкой 8 мг/л НУК вызывала каллусогенез и формирование зачаточных побегообразных структур, рост которых быстро прекращался. Очевидно, уровень эндогенного цитокинина у исходного генотипа недостаточно высок для поддержания гормонального баланса, необходимого для регенерации, при высокой концентрации экзогенного ауксина.

Основной задачей культивирования регенерантов нулевого поколения является размножение путем клонирования и получение семян. В наших опытах нут не плодоносил *in vitro*, в отличие от сои, поэтому молодые растения необходимо готовить к высадке в почву, а для этого они должны иметь развитые листья и корни (см. рис. 18, рис. 20).

Клонирование нута в культуре стеблевых узлов на среде MS с добавкой БАП приводило к образованию множества коротких адвентивных побегов с зачатками листьев, без корней и каллуса (табл. 25). Увеличение концентрации БАП стимулировало частоту стеблевого морфогенеза и выход побегов, снижая их высоту и степень развития (рис. 20).

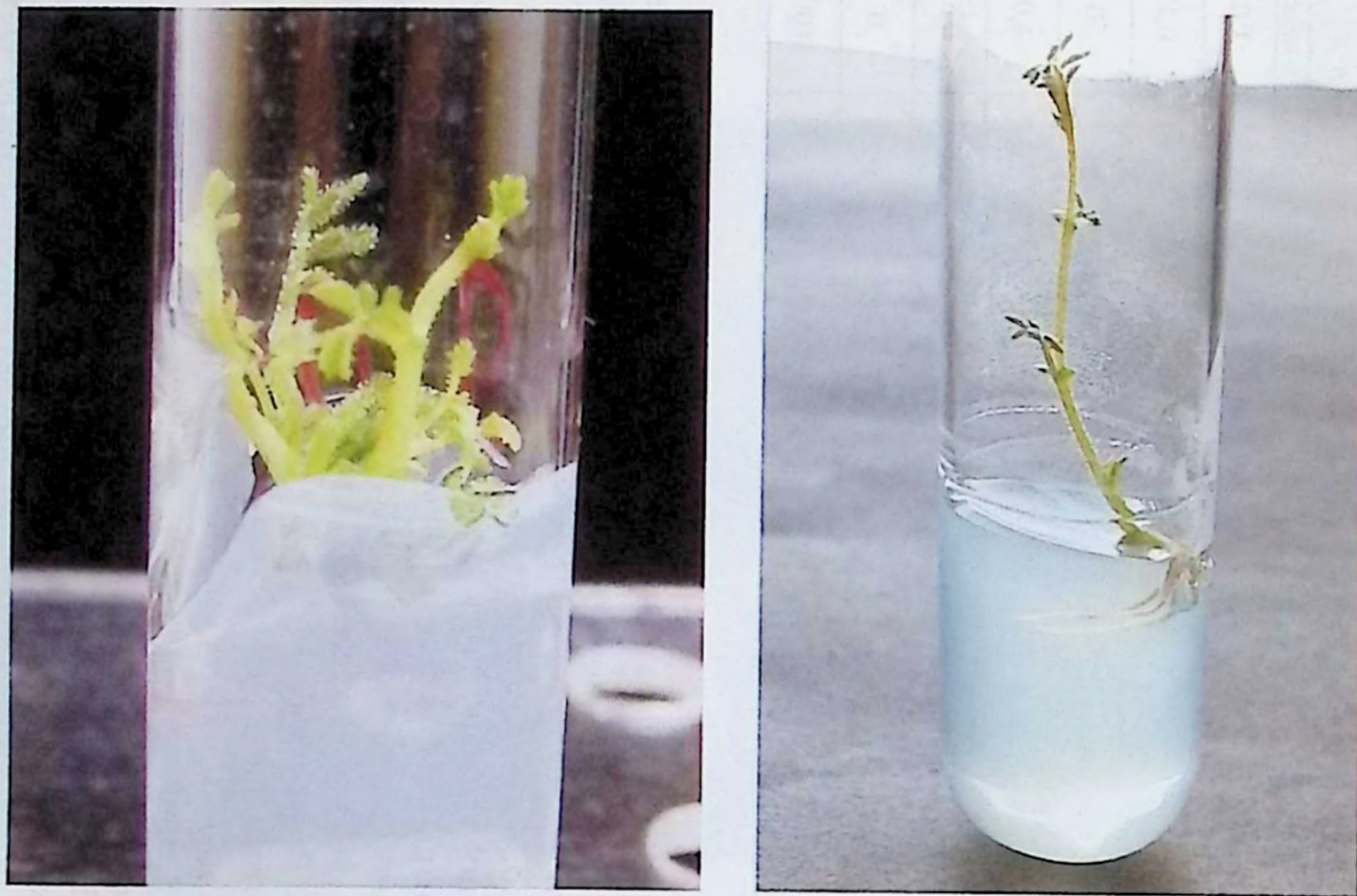


Рис. 20. Клонирование нута в культуре стеблевых узлов (слева) и растение-регенерант нута с корнями (справа)

Т а б л и ц а 25

**Влияние БАП на морфогенез в культуре стеблевых узлов нута
Краснокутский 123**

Признак	MS + БАП 1 мг/л	MS+ БАП 4 мг/л
Частота каллусогенеза, %	0	0
Частота побегообразования, %	88	100
Частота ризогенеза, %	0	0
Число побегов на эксплант	4,6	5,8
Высота побегов, см	1,5	0,8
Число листьев на эксплант	0	0

Культивирование регенерантов на среде 1/2 В5 без гормонов способствовало достижению состояния пригодности к высадке за 4 – 5 недель, однако частота образования корней не превышала 50%, а рост их был медленным. Добавки фитогормонов оказали значительное влияние на развитие растений. Определяя оптимальный состав среды для культивирования регенерантов, мы поставили серию опытов, результаты которых представлены в таблице 26.

Добавка кинетина способствовала усиленной вторичной регенерации побегов из разросшейся базальной части первичного регенеранта. Адвентивные побеги были в основном слабо дифференцированными, с аномальными витрифицированными листьями и стеблями, склонными к побурению и отмиранию. Если на среде с 1 мг/л кинетина многие побеги нормально росли и формировали корни, то при увеличении концентрации цитокинина замедлялся рост побегов и прекращался ризогенез.

Т а б л и ц а 26

**Влияние экзогенных фитогормонов на развитие регенерантов нута
Краснокутский 123**

Признак	Среда 1/2 В5 + фитогормон (мг/л)							
	кине- тин 1	кине- тин 2,5	кине- тин 2,5 + ИМК 0,3	ИМК 0,2	ИМК 0,2+ СИ* 0,0001	НУК 1	2,4-Д 1	ИУК 1
Частота ризогенеза, %	40	0	0	53	75	69	46	82
Количество корней	0,8	0	0	-	-	6,4	10,0	5,5
Длина корней, см	1,7	0	0	4,0	2,1	0,5	0,9	2,2
Количество побегов	8,3	1,4	5,5	5,3	1,0	2,1	1,6	1,9
Высота побегов, см	4,2	2,4	1,4	3,6	9,0	2,1	2,9	5,4
Количество листьев	4,0	-	-	2,5	2,5	3,3	2,3	6,4
Гибель побегов, %	25	33	0	-	-	-	-	-

*Примечание: СИ – симбионт Иванова, регулятор роста грибного происхождения

Присутствие экзогенного ауксина ИМК в среде с кинетином не способствовало ризогенезу и замедляло рост побегов, но предохраняло их от побурения и гибели.

В отсутствие экзогенных цитокининов добавление в среду ауксинов стимулировало образование корней и адвентивных побегов. На среде с ИМК происходила интенсивная вторичная регенерация побегов из базальной части, ризогенез и быстрый рост корней у каждого второго экспланта, при отсутствии каллусообразования. На такой же среде с добавкой регулятора роста грибного происхождения «Симбионт Иванова» вторичная регенерация побегов не происходила, но достоверно увеличился каллусогенез, ризогенез и рост побегов в высоту. Эффект «Симбионта Иванова» был подобен действию ауксина, причем в чрезвычайно малой дозе этот регулятор роста заметно сдвинул гормональный баланс.

Наиболее благотворное воздействие на развитие регенерантов оказала добавка ИУК в концентрации 1 мг/л, способствовавшая увеличению частоты ризогенеза до 90% и достаточно быстрому росту и развитию растений. Для ускоренного размножения регенерантов мы часто использовали среду 1/2B5 с кинетином в концентрации 0,5 – 1 мг/л. Растения с корнями высаживали в почву, а неукоренившиеся – клонировали в культуре стеблевых узлов.

Темпы роста *in vitro* отдельных растений-регенерантов сильно варьировали даже в одинаковых условиях культивирования. В таблице 27 приведены данные наблюдений за развитием пятидесяти четырех растений в течение 50 – 60 дней на среде 1/2 B5 с добавкой кинетина 1 мг/л. Вариабельность была очень высокой, особенно по высоте растений, длине корней, ветвистости.

Выращивание регенерантов в почве. Растения-регенеранты R₀ с развитыми корнями высаживали в горшки с почвой. После пересадки каждый второй регенерант погибал по разным причинам, снижающим способность к адаптации *in vivo*. Растения с нежным, слабым стеблем, удлиненными междоузлиями, с каллусом у основания побега плохо переносят пересадку в почву. Иногда у них отсутствует или ослаблена связь сосудов между стеблем и корнем, что исключает или затрудняет выживание *ex vitro* (Altaf, Ahmad, 1990). Растения, благополучно пережившие процесс адаптации, через несколько дней возобновляют рост. Существует два варианта условий их дальнейшего развития:

1. выращивание до созревания в лабораторных условиях;
2. высадка в полевой питомник после периода адаптации.

Ход развития регенерантов R_0 в вегетационных сосудах вплоть до созревания семян представлен в таблице 27. Изменчивость по высоте и количеству узлов значительно уменьшилась по сравнению с этапом культивирования *in vitro* за счет выпадения растений с тяжелыми аномалиями морфогенеза, однако варьирование по другим элементам вегетативной сферы осталось на прежнем уровне, дополненное высокой изменчивостью по числу генеративных органов. В среднем один из трех цветков завязывал боб с одним, редко двумя семенами. Выращивание растений-регенерантов нута R_0 в поле имеет свои проблемы, главная из которых – неблагоприятные погодные условия, но в случае жаркого и засушливого лета можно получить более 100 семян от каждого растения.

Т а б л и ц а 27
Изменчивость признаков растений-регенерантов нута R_0

Признак	Среднее арифметическое	Лимиты	Коэффициент вариации, %
<i>In vitro</i>			
Высота, см	4,5	1,2 - 19,5	105
Количество корней	3,1	0 - 15	50
Длина корней, см	3,5	0,3 - 18,0	124
Количество: ветвей	1,2	0 - 4	94
узлов	4,3	1 - 10	48
листьев	12,2	2 - 27	44
<i>In vivo (в вегетационных сосудах)</i>			
Период до созревания, дней	149,6	97 - 189	20
Высота, см	75,4	10 - 98	15
Количество: ветвей I порядка	1,8	1 - 7	98
узлов	30,4	6 - 40	18
листьев	37,9	7 - 78	43
цветков	12,0	1 - 26	63
бобов	3,7	1 - 9	67

Итак, нами определены следующие условия культивирования и закономерности морфогенеза *in vitro* нута Краснокутский 123:

1. Каллусогенез в эксплантированных тканях проростков происходит на средах MS и B5 с добавками кинетина, БАП, НУК, 2,4-Д и 2,4,5-Т, что говорит о слабой зависимости процесса от экзогенных регуляторов роста.

2. Условия освещенности при культивировании влияют на пролиферацию каллусной ткани: свет ингибирует каллусогенез на первичных эксплантах и стимулирует рост пассированного каллуса.

3. Цитокинин БАП в концентрациях от 0,5 до 4 мг/л способствует регенерации растений из тканей семядольного узла и измельченного зрелого зародыша нута путем стеблевого органогенеза.

4. Добавление кинетина в концентрациях от 0,25 до 1 мг/л в среду для культивирования растений-регенерантов нута стимулирует появление адвентивных побегов в базальной части и способствует росту стеблей, листьев, корней. Добавление ИУК увеличивает частоту ризогенеза у регенерантов и улучшает рост побегов.

Количественная изменчивость соматклонов нута в полевых испытаниях

Семена первого и последующих поколений высевали в конце второй – начале третьей декады мая на опытном поле СибНИИ кормов (г. Новосибирск) вручную, с расстоянием между растениями в рядке 10 см, между рядками – 60 см (рис. 21). Морфометрические признаки определяли в выборках объемом 20 растений после созревания. Фитопатологическое обследование проводили сотрудники СибНИИ кормов З.В. Агаркова, Л.Ф. Ашмарина, Н.М. Коняева. Микологический анализ пораженных семян нута был проведен Л.Н. Коробовой в Новосибирском государственном аграрном университете, результаты опубликованы (Рожанская и др., 2002).



Рис. 21. Соматклоны нута в полевом питомнике (фаза цветения).

Погодные условия имеют жизненно важное значение для нута в сибирской лесостепи. Вегетационный сезон 1998 г. характеризовался несколько повышенной температурой и пониженным количеством осадков по сравнению со средними многолетними, а лето 1999 г. было экстремально сухим и жарким для Сибири (см. рис. 8). Последующие три сезона подряд (2000, 2001, 2002 гг.) отличались повышенным количеством осадков и прохладным июлем. Сезон 2003 г. был жарким и засушливым, а в 2004 г. майская жара и раннелетняя засуха сменились сырой и прохладной погодой во второй половине лета. Для нута условия 1998, 1999 и 2003 гг. были благоприятными, а 2000 – 2002 и 2004 гг. – неблагоприятными, что позволило провести оценку изменчивости соматклонов на естественном селективном фоне.

Изменчивость количественных признаков была проанализирована у четырех поколений потомств регенерантов нута, и результаты анализа представлены в таблице 28.

У двадцати трех растений R_1 , выращенных в поле в 1998 г., заметно варьировали морфологические признаки и наблюдались физиологические различия по темпам роста. Два растения имели высоту менее 50 см, четыре – отличались повышенной ветвистостью, четыре регенеранта образовали большое количество бобов (94 – 124) и семян (111 – 148), шесть низкопродуктивных растений сформировали от 3 до 20 бобов и от 2 до 20 семян, одно было бесплодным. Количество семян в бобе в среднем не намного превышало 1, но у одного растения более половины бобов содержали по два семени, а у трех других растений все бобы были односемянными или пустыми. Количество недоразвитых семян также варьировало: у половины растений все семена были полноценными, у других обнаружено по 1 – 3 недоразвитых семени, и лишь у трех растений доля неполноценных семян превышала 10%. Коэффициенты вариации достигали: по признаку ветвистости 38%, по признакам генеративной сферы (числу бобов и семян, массе семян на одном растении) превышали 70%.

В 1999 г. сухая и жаркая погода привела к снижению средней высоты растений нута за счет верхнего лимита и увеличению ветвистости за счет нижнего лимита (см. табл. 28). В среднем сильно возросла семенная продуктивность, количество семян в бобе, масса 1000 семян. Период от посева до созревания составил у исходного сорта 90 дней, у соматклонов от 86 до 108 дней. Все семена

Т а б л и ц а 28

Изменчивость в четырех поколениях соматклонов нута

Признак	Поколение	Среднее арифметическое	Лимиты	Коэффициент вариации, %
Высота, см	R ₁ (1998 г.)	64,6±1,6	48-75	11,7
	R ₂ (1999 г.)	57,8±1,1	46,5-67,0	8,5
	R ₃ (2000 г.)	88,0±1,4	75,8-105,8	8,7
	R ₄ (2001 г.)	98,2±1,2	82,7-106,8	6,0
Число ветвей I порядка	R ₁ (1998 г.)	5,3±0,4	2-9	37,8
	R ₂ (1999 г.)	6,8±0,2	4,7-8,9	12,9
	R ₃ (2000 г.)	2,8±0,2	1,5-5,2	43,7
	R ₄ (2001 г.)	2,8±0,1	1,9-3,8	17,7
Число бобов	R ₁ (1998 г.)	49,7±7,2	0-124	70,4
	R ₂ (1999 г.)	53,1±3,0	7,5-67,8	25,6
	R ₃ (2000 г.)	30,6±2,3	4,9-50,7	40,2
	R ₄ (2001 г.)	31,9±1,7	21,7-50,9	25,6
Число семян	R ₁ (1998 г.)	56,2±8,5	0-148	74,3
	R ₂ (1999 г.)	81,0±5,8	8,7-123,0	32,5
	R ₃ (2000 г.)	27,8±2,6	1,0-54,9	50,6
	R ₄ (2001 г.)	22,1±1,5	11,4-39,5	33,3
% недоразвитых семян	R ₁ (1998 г.)	3,2±1,1	0-22,2	167,2
	R ₄ (2001 г.)	46,5±3,4	27,3-100,0	35,4
% пораженных семян	R ₃ (2000 г.)	47,9±2,8	17,6-79,2	32,0
	R ₄ (2001 г.)	18,1±3,5	2,1-85,8	94,4
Количество семян в бобе	R ₁ (1998 г.)	1,04±0,06	0-1,39	28,9
	R ₂ (1999 г.)	1,50±0,06	0,85-2,00	17,2
	R ₃ (2000 г.)	0,84±0,05	0,11-1,29	34,3
	R ₄ (2001 г.)	0,66±0,03	0,39-1,03	23,3
Масса семян на растение, г	R ₁ (1998 г.)	14,1±2,4	0-34,0	82,8
	R ₂ (1999 г.)	23,3±1,6	1,2-32,4	31,7
	R ₃ (2000 г.)	5,5±0,5	0,3-10,2	46,2
	R ₄ (2001 г.)	2,7±0,2	1,6-4,7	35,3
Масса 1000 семян, г	R ₁ (1998 г.)	239,0±14,6	60,0-344,4	29,3
	R ₂ (1999 г.)	284,4±10,4	142,6-359,1	16,8
	R ₃ (2000 г.)	226,0±7,5	173,6-320,0	18,2
	R ₄ (2001 г.)	123,1±4,8	64,4-155,2	18,9

были выполненными. Две линии оказались на 4 дня более скоро-спелыми, чем исходный сорт, они же имели повышенное количество ветвей I порядка, бобов, семян, двухсемянных бобов. Пять линий выгодно отличались по семенной продуктивности и массе 1000 семян, а у одной линии имелись трехсемянные бобы.

Изменчивость корреляций признаков нута

Корреляции несут ценную информацию о взаимодействии генотипа и окружающей среды. По итогам полевых испытаний в условиях 1999 г. были вычислены внутрилинейные парные коэффициенты корреляции некоторых признаков по Пирсону. В таблице 29 представлены результаты этого анализа.

У исходного сорта Краснокутский 123 высота расположения нижнего боба положительно коррелировала с высотой растения; отрицательно – с ветвистостью. Из двадцати четырех соматклонов лишь у четырех обнаружены достоверные положительные связи между высотой растения и высотой размещения нижнего боба. Отрицательная связь высоты размещения нижнего боба и ветвистости была свойственна большей части соматклонов, но у пяти линий эти признаки коррелировали положительно ($r = 0,51 - 0,71$). У половины соматклонов имелись аналогичные исходному сорту более или менее тесные связи между высотой растений и количеством бобов ($r = 0,51 - 0,79$).

Пара признаков “число ветвей I порядка” и “число бобов”, как и у исходного сорта, была связана положительно у большинства соматклонов, и лишь у одной линии обнаружена отрицательная корреляция ($r = - 0,45$). Остальные две пары проанализированных признаков у исходного сорта не проявили какой-либо зависимости друг от друга; у десяти соматклональных линий отмечены достоверные положительные корреляции высоты растений с ветвистостью; у шести линий выявлена отрицательная, у одной – положительная связь между высотой расположения нижнего боба и количеством бобов.

Межлинейные корреляции признаков нута в 1999 г. представлены в таблице 30. Вегетационный период отрицательно коррелировал с количеством семян на растении и в бобе, что само по себе интересно, поскольку обычно продолжительность развития растения положительно связана с элементами продуктивности, например, у сои. Более того, вегетационный период нута не коррелиро-

вал с признаками вегетативной сферы: высотой, массой, ветвистостью. По-видимому, более скороспелые формы успели после июньских дождей заложить большее количество генеративных органов, чем позднеспелые, до прекращения роста нута вследствие засухи. Отсюда отрицательные связи продуктивности с вегетационным периодом.

Т а б л и ц а 29

Парные коэффициенты внутрилинейной корреляции признаков нута, 1999 г.

Линии	Высота растений –			Высота размещения нижнего боба –		Число ветвей I порядка –
	– высота размещения нижнего боба	– число ветвей I порядка	– число бобов	– число ветвей I порядка	– число бобов	– число бобов
1	0,31	0,42	0,58*	-0,21	-0,14	0,80*
2	0,52*	-0,22	0,09	-0,23	-0,39	0,58*
3	0,51*	0,65*	0,25	0,71*	0,44*	0,26
4	0,49*	-0,14	0,09	-0,62*	-0,34	0,69*
5	-0,07	0,48*	0,67*	-0,49*	-0,28	0,44*
6	0,11	0,11	-0,03	-0,64*	-0,54*	0,82*
7	0,31	0,02	0,42	-0,38	-0,36	0,62*
8	0,33	0,54*	-0,07	0,52*	0,05	0,06
9	-0,38	0,22	0,79*	-0,41	-0,55*	0,46*
10	0,21	0,31	-0,19	0,53*	0,03	-0,14
11	0,17	0,52*	0,51*	-0,29	-0,04	0,83*
12	0,08	0,65*	0,58*	-0,46*	-0,14	0,38
13	-0,19	0,17	0,64*	-0,71*	-0,56*	0,60*
14	0,18	0,42	0,65*	-0,22	-0,32	0,76*
15	-0,21	0,64*	0,64*	-0,38	-0,11	0,71*
16	-0,04	0,11	0,13	-0,83*	-0,75*	0,90*
17	0,01	0,30	0,76*	0,03	-0,29	0,42
18	-0,20	-0,37	0,29	-0,44*	-0,58*	-0,06
19	0,29	0,31	0,65*	-0,19	-0,13	0,60*
20	0,18	0,31	0,00	0,56*	-0,26	-0,45*
21	-0,25	0,45*	-0,20	0,34	-0,18	-0,10
22	0,66*	0,56*	0,65*	0,52*	0,32	0,53*
23	-0,23	0,87*	0,63*	-0,46*	-0,80*	0,79*
24	0,17	0,64*	0,57*	-0,40	-0,26	0,72*
Краснокутский 123	0,47*	0,02	0,82*	-0,64*	0,07	0,44*

* – достоверно на 5 % уровне

Т а б л и ц а 3 0

Межлинейные корреляции признаков нута в 1999 г.

Пары признаков	Коэффициент корреляции
Вегетационный период – высота растения	0,27
Вегетационный период – масса растения	– 0,04
Вегетационный период – число ветвей I порядка	– 0,14
Вегетационный период – число бобов на растении	0,42
Вегетационный период – число семян на растении	– 0,61*
Вегетационный период – число семян в бобе	– 0,65*
Вегетационный период – масса семян на растении	– 0,38
Вегетационный период – масса 1000 семян	0,26
Высота – число бобов на растении	0,35
Высота – масса 1000 семян	0,59*
Число ветвей I порядка – масса растения	0,52*
Число ветвей I порядка – число бобов на растении	0,56*
Число ветвей I порядка – число семян на растении	0,54*
Число ветвей I порядка – масса семян на растении	0,45*
Число бобов – масса растения	0,46*
Число бобов – число семян на растении	0,90*
Число бобов – масса семян на растении	0,88*
Число семян – масса растения	0,53*
Число семян на растении – число семян в бобе	0,69*
Масса семян на растении – масса растения	0,47*
Масса семян на растении – число семян на растении	0,90*
Масса семян на растении – число семян в бобе	0,58*
Масса семян на растении – масса 1000 семян	0,52*

* - достоверно на 5%-м уровне

Остальные корреляции были естественны для нормально развивающихся однолетников, несмотря на засуху, что подчеркивает ксерофильность нута. Высота растений прямо коррелировала с крупностью семян, ветвистость – с массой растения, числом бобов и семян, массой семян. Количество бобов прямо зависело от мощности растения и определяло семенную продуктивность, которая в свою очередь была тесно связана с числом семян в бобе и массой семени.

Устойчивость сомаклонов к грибной инфекции

В 2000 г. теплое и дождливое лето (см. рис. 8) способствовало увеличению вегетативного роста нута, удлинению периода цветения, полеганию и развитию грибных болезней. Растения были убраны с цветками в верхней части и созревшими нижними бобами.

Вегетационный период от посева до уборки составил у исходного сорта 109 дней, у соматклонов варьировал от 105 до 118 дней.

По сравнению с предыдущими годами в среднем значительно увеличилась высота растений при снижении ветвистости, уменьшилось количество плодов и семян (многие бобы были пустыми); многократно уменьшилась семенная продуктивность (см. табл. 28). В среднем почти половина семян были поражены грибной инфекцией и покрыты плесенью, причем между линиями этот показатель варьировал от 17,6 до 79,2%, а внутри линий встречались растения с долей пораженных семян не более 3%.

Анализ микрофлоры на заплесневевших семенах нута показал преобладание спор *Ascochyta rabiei*, возбудителя аскохитоза (табл. 31), на втором месте были грибы рода *Cladosporium*, на третьем – *Aspergillus*. Зараженность семян грибами рода *Fusarium* была невелика. Достоверных различий между линиями по видовому составу микрофлоры не обнаружено.

Сырое лето 2001 года в сочетании с прохладной погодой в период оплодотворения нута создало исключительно неблагоприятные условия для его нормального развития и в то же время позволило провести оценку толерантности соматклонов к этим факторам. В полевом питомнике выращивались линии четвертого поколения регенерантов из семян наиболее продуктивных растений с наименьшей долей заплесневевших семян урожая 2000 г. Период цветения нута затянулся до сентября и растения были убраны

Т а б л и ц а 3 1
Видовой состав микрофлоры семян нута, 2000 г.

Вид	Зараженность, %
<i>Ascochyta rabiei</i>	56,3
<i>Fusarium spp.</i>	2,7
<i>Cladosporium herbarum</i>	13,0
<i>Cladosporium spp.</i>	10,6
<i>Penicillium rubrum</i>	1,2
<i>Penicillium spp.</i>	1,0
<i>Aspergillus niger</i>	8,3
<i>Aspergillus spp.</i>	0,3
<i>Trichotecium roseum</i>	3,0
<i>Stysanus</i>	2,0
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	0,3
<i>Dicccum spp.</i>	0,3
Прочие	1,0

зелеными, в связи с чем данные о длине вегетационного периода отсутствуют. Увеличение высоты растений сопровождалось снижением количества и завязываемости семян и двукратным уменьшением их массы. Около половины семян были недоразвитыми, остальные – щуплыми (см. табл. 28).

Фитопатологическое обследование питомника нута в 2001 г. выявило значительное распространение аскохитоза и поражение корневыми гнилями (табл. 32). Обследование показало повышение устойчивости к аскохитозу у ряда соматональных линий по сравнению с исходным сортом Краснокутский 123. Из 21 соматональной линии выделены 9 более устойчивых, в то же время 2 соматона оказались значительно менее устойчивыми к

Т а б л и ц а 3 2

Пораженность соматоналов нута болезнями, 2001 г.

Линия	Аскохитоз		Корневая гниль: пораженность, %
	индекс развития, %	распространение, %	
1	12,2+	29,4+	4,8+
2	12,6+	32,2+	16,8 –
3	35,8	68,7	13,7 –
4	25,3	65,6	6,5
5	8,2+	30,1+	6,3
6	28,4	65,1	9,0
7	14,7+	29,2+	3,3+
8	19,6	40,0	9,4
9	13,6+	31,2+	5,2
10	9,7+	28,4+	8,8
11	22,9	64,6	11,6
12	14,2+	26,6+	4,5+
13	30,0	46,7	8,8
14	10,9+	26,1+	5,2
15	22,0	70,0	9,0
16	23,3	67,2	7,8
17	25,7	65,6	5,8
18	46,1 –	75,0 –	22,0 –
19	22,4	55,3	8,4
20	13,3+	32,0+	5,0+
21	46,6 –	72,0 –	18,0 –
Краснокутский 123	23,3	60,0	7,4

Примечание: + более устойчивые линии, – менее устойчивые

аскохитозу и поражались в 1,5 – 2 раза сильнее исходного сорта. Все линии в разной степени поражались фузариозной корневой гнилью, при этом 4 были более устойчивы, другие 4 линии более восприимчивы, чем Краснокутский 123. Комплексное повышение устойчивости к болезням продемонстрировали четыре соматклона, понижение – два.

Распределение соматклонов по характеру и степени изменчивости в отношении устойчивости к аскохитозу является несимметричным вследствие отбора растений с наименее пораженными семенами, проведенного в 2000 г. Распределение по степени устойчивости к корневым гнилям более симметрично по отношению к исходному сорту и несколько сдвинуто в сторону снижения, что характерно для соматклональной изменчивости по тщательно отселектированным признакам. Поскольку сорт Краснокутский 123, безусловно, создавался с применением методов отбора по устойчивости к патогенам, расшатывание генотипа с помощью соматклональной изменчивости с большей вероятностью ухудшает показатель, чем улучшает, что ведет к преобладанию среди соматклонов менее устойчивых форм.

В 2000 г. из тридцати двух изученных соматклонов была выявлена одна относительно устойчивая линия с уменьшенной пораженностью семян грибной инфекцией (17%). Таким образом, частота положительных вариаций признака пораженности семян составила 3%. В 2001 г., после отбора, частота встречаемости позитивных отклонений от уровня исходного сорта по устойчивости к грибным патогенам составила 43%. Приведенные результаты говорят о том, что даже однократный индивидуальный отбор по степени пораженности семян дает хороший эффект и позволяет выделить материал, вдвое менее восприимчивый к аскохитозу как по развитию, так и по распространению болезни.

Причиной значительной количественной изменчивости в первом поколении регенерантов нута (см. табл. 28) могла быть неодинаковая жизнеспособность семян, полученных в лабораторных условиях от растений R_0 . Растения-регенеранты часто имеют морфологические нарушения развития вследствие экстремальных воздействий условий *in vitro* и стресса при пересадке в почву.

Пониженная вариабельность в поколении R_2 является следствием благоприятных для нута погодных условий. В.А. Драгавцев (1995) объясняет подвижность фенотипических параметров в по-

левых экспериментах сменой спектра локусов при изменении внешних лимитирующих факторов, подчеркивая, что этот феномен затрагивает лишь промежуточные этапы пути "продукт гена – признак", не изменяя активность генов и "разрешая" им работать. Благоприятные для нута погодные условия означают отсутствие лимитирующих факторов, способных вызвать переопределение спектров генов количественных признаков.

Увеличение вариабельности в поколении R_3 в присутствии лимитирующего фактора – повышенной влажности – свидетельствует о гетерогенности популяции соматклонов нута. Снижение дисперсии в поколении R_4 , на фоне двух лимитирующих факторов (высокой влажности и пониженной температуры в фазе цветения) – результат отбора на продуктивность и иммунитет к грибным патогенам.

Изменение структуры корреляций между признаками у соматклонов по сравнению с исходным сортом (см. табл. 29) свидетельствует о генетических различиях между линиями или внутрелинейной гетерогенности соматклонов по степени проявления количественных признаков.

Анализ микрофлоры пораженных семян нута (см. табл. 31) показал значительное видовое разнообразие грибов, из которых только *Ascochyta* и *Fusarium* являются паразитами, прочие же виды заселяют уже омертвевшие ткани пораженных семян в условиях высокой влажности. По-видимому, заражение фузариозом происходит в основном через почву (Билай, 1977), поэтому отбор растений нута с наименьшей долей заплесневевших семян является отбором на устойчивость к аскохитозу. Кроме того, согласно В.А. Драгавцеву (1995), отбор на продуктивность в условиях лимитирующего фактора является отбором на устойчивость к этому фактору. Это подтверждают результаты фитопатологического обследования (см. табл. 32), где распределение двенадцати наиболее отклоняющихся от исходного сорта линий было асимметричным по признаку пораженности аскохитозом (9:2) и симметричным по пораженности фузариозом (4:4).

Влияние отбора на пораженность семян грибной инфекцией выразилось в сдвиге распределения соматклонов по этому признаку. Семена у половины линий из семян урожая 1999 г. были поражены сильнее, чем у исходного сорта, у другой половины – значительно слабее. Симметричное распределение соматклонов, как правило, наблюдается при отсутствии отбора. У соматклонов из семян

урожая 2000 г. после однократного отбора обнаружена асимметрия распределения: 30% линий были менее устойчивы, чем исходный сорт, 70% более устойчивы.

Сомаклоны нута с повышенной семенной продуктивностью

В 2002 г. в полевом питомнике испытывались линии, отобранные по признаку устойчивости к патогенам, а именно пятьдесят образцов четвертого поколения регенерантов из семян наиболее продуктивных растений с наименьшей долей заплесневевших семян урожая 2000 г.

Созревание было растянутым: нижние бобы начали созревать в конце августа, но даже в сентябре большинство растений продолжали цветение по причине теплой погоды. Тем не менее урожай был убран и проанализирован по морфометрическим признакам, в результате чего выделены шесть линий с повышенной продуктивностью (табл. 33, рис. 22). В целом большинство соматклонов уступали исходному сорту по развитию вегетативных признаков (массы и ветвистости растений) и при этом имели достоверно менее инфицированные и щуплые семена, чем Краснокутский 123. Это говорит о повышении устойчивости в популяции соматклонов:

- к сырой погоде, затягивающей развитие нута и вызывающей чрезмерный вегетативный рост;
- к грибным патогенам, поражающим не только листья и стебли, но и семена.

Фитопатологическое обследование соматклонов нута в 2002 г. выявило значительное распространение аскохитоза (до 100%) и пораженность корневыми гнилями (до 100%). Из семидесяти образцов выделено семнадцать с индексом развития аскохитоза менее 25%, остальные линии, как и стандарт, были восприимчивы в средней степени. Все соматклоны поражались фузариозной корневой гнилью; двенадцать были относительно устойчивы (пораженность менее 20%), а один – более восприимчив, чем Краснокутский 123. Комплексную устойчивость к болезням продемонстрировали десять линий, восприимчивость – одна линия.

По итогам испытания 2002 г., однократный отбор среди соматклонов нута по пораженности семян привел к появлению более устойчивых форм. Частота встречаемости толерантности к аскохитозу составила 24%, к фузариозу – 17%. Повысилась завязываемость

Т а б л и ц а 3 3

Признаки высокопродуктивных соматклонов нута IV поколения, 2002 г.

Линия, №	Сухая масса растения, г	Число бобов на растении	Число семян		Масса 1000 семян, г	Число семян в бобе
			на растении	щуплых		
1	74,4	81,9	75,3	3,6*	224	0,92
4	60,3	66,1	76,1	5,3*	223	1,15*
6	83,9	95,2*	98,4*	8,2*	182	1,01
17	78,0	102,3*	124,7*	13,9	182	1,17*
29	84,1	71,4	79,0	12,4	229	1,09
41	95,0*	114,9*	113,0*	40,3*	225	1,06
Контроль	67,0	63,4	61,2	16,1	205	0,96

*- различия достоверны на 10 % уровне, контроль – Краснокутский 123

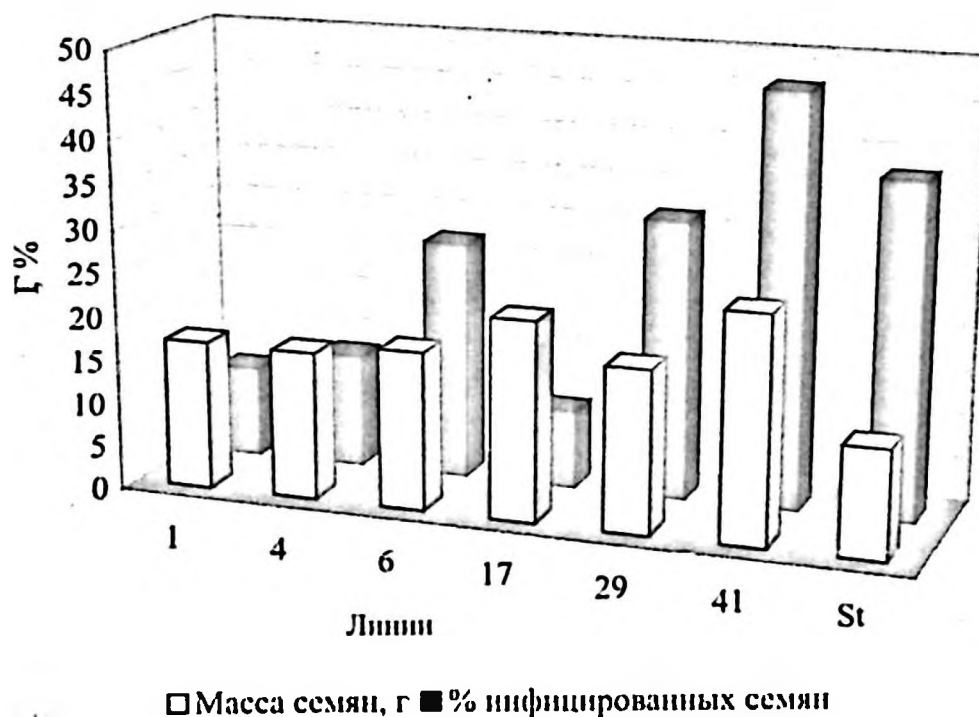


Рис. 22. Устойчивость к патогенам высокопродуктивных соматклонов нута IV поколения, 2002 г. St – Краснокутский 123

семян в бобах и достоверно снизилась доля щуплых и инфицированных семян у 84% линий соматклонов нута по сравнению со стандартом Краснокутский 123.

В 2003 г. испытывались потомства регенерантов нута четвертого поколения из семян урожая 2000 г. от наиболее продуктивных растений с наименьшей пораженностью грибной инфекцией. Ре-

зультаты испытаний представлены в таблице 34 и на рисунке 23. Фитопатологическое обследование питомника не выявило значительной распространенности и развития болезней, в первую очередь из-за сухой и жаркой погоды. В фазе ветвления нут был сильно поврежден зайцами, и в результате массового отрастания побегов после стравливания увеличилась ветвистость, удлинился период вегетации, цветение было недружным и продолжительным. Благоприятные для нута погодные условия позволили растениям сформировать плоды и семена, хотя и не все они созрели к моменту уборки в конце сентября.

Т а б л и ц а 3 4

Признаки соматклонов нута R₄ с повышенной продуктивностью, 2003 г.

Образец	Сухая масса 1 растения, г	Число бобов	Число семян на растении	Число семян в бобе	Масса 1000 семян, г
VII-1 (88)	43,2	58,7	74,8	1,25	184,3***
VII-13 (101)	50,3	60,4	81,2	1,31	167,2
V-4 (R854)	47,7	54,9	75,0	1,30	166,7
V-14 (R893)	51,0	63,1	90,9**	1,41**	178,3*
VI-6 (101)	57,5*	72,0**	78,9	1,11***	149,1
VII-14	59,8**	74,9***	92,0**	1,22	141,2*
VII-11	37,4	47,2	66,6	1,41***	186,4***
VII-12	65,2***	79,2***	102,4***	1,30	120,7***
Краснокутский 123	46,0	52,8	70,1	1,28	161,2

*- различия достоверны на 10%-м; ** - 5 %-м; ***- 1%-м уровне значимости

Среди соматклонов IV поколения количество бобов на растении варьировало в пределах 22,4 – 79,2; число семян – от 24,2 до 102,4; масса семян на растении составляла 5,0 – 16,4 г; в бобе завязывалось от 0,89 до 1,46 семян; поражались грибной инфекцией от 0,04 до 55% семян. Масса 1000 семян у соматклонов варьировала в пределах 99,3 – 204,9 г..

Две линии достоверно превысили уровень исходного сорта по массе семян на растении, три – по числу семян и столько же – по числу бобов, причем ни одна не выделилась одновременно по всем элементам продуктивности, но семь из них превосходили исходный сорт по устойчивости к поражению семян грибной инфекцией

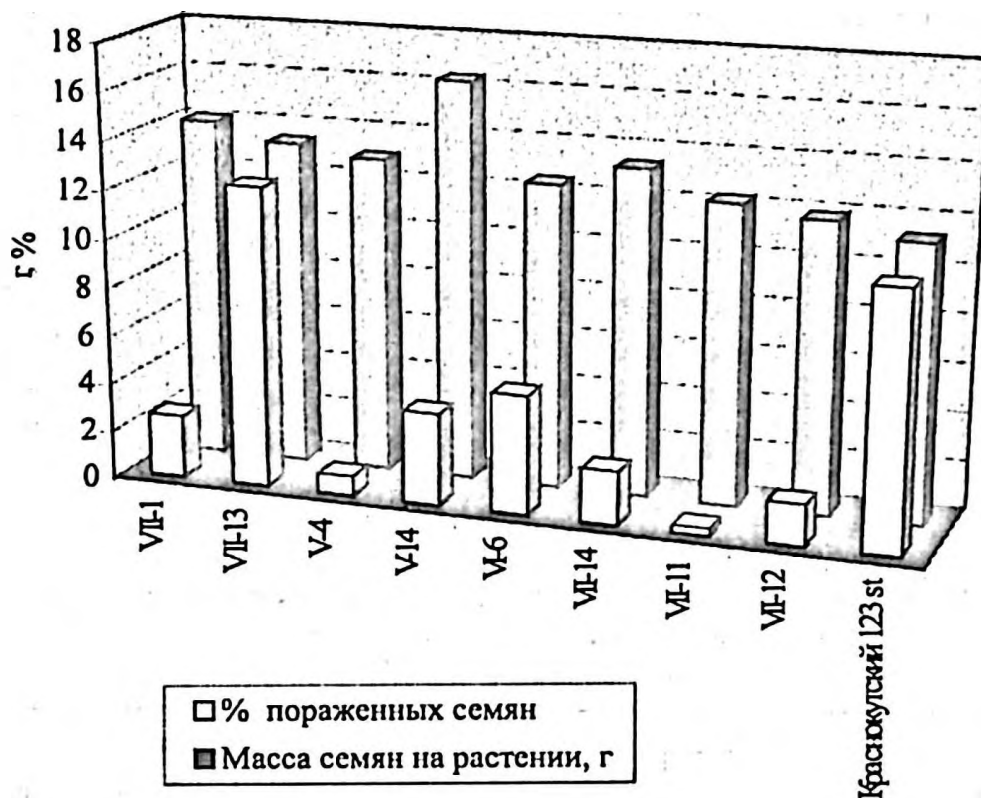


Рис. 23. Устойчивость к грибным патогенам высокопродуктивных соматклонов нута IV поколения, 2003 г.

Соматклональная изменчивость в культуре семядольных узлов нута

По мнению известных специалистов N. Altaf и M.S. Ahmad (1990), регенерация растений нута из семядольных узлов происходит за счет предсуществующей меристемы. Если это так, то геном регенерантов формируется под контролем исходного организма и соматклональная изменчивость практически исключается, как при микроклональном размножении. Для оценки степени изменчивости рассмотрим признаки потомств одного растения-регенеранта R₀ 723, полученного в 1997 г. в регенерационной системе семядольного узла нута Краснокутский 123.

Из семян этого регенеранта в 1998 г. в полевом питомнике были выращены семь растений R₁. Высота их варьировала от 48 до 75 см, число бобов – от 19 до 98, число семян на растении от 15 до 90, масса семян – от 0,9 до 29,8 г. Возможно, основной причиной такой изменчивости была разнокачественность семян,

полученных от R₀ после модифицирующего воздействия условий *in vitro*. В следующем, 1999 году семена каждого из семи растений R₁ были высеяны на отдельных делянках как линейные потомства. Результаты наблюдений и измерений представлены в таблице 35.

Все растения имели красно-фиолетовую окраску цветков, как у исходного сорта, но окраска семенной оболочки варьировала от бежевой до темно-коричневой. Линия R83 выделилась позднеспелостью, высокорослостью и малым количеством семян в бобе, R87 – скороспелостью, повышенной фертильностью и разнообразием окраски семян. Линия R88 отличалась более тонкими стеблями

Т а б л и ц а 3 5

**Изменчивость во II поколении потомств регенеранта R₀ 723,
полученного в культуре семядольного узла нуга
Краснокутский 123, 1999 г.**

Линия R ₂	Веgetационный период	Высота, см	Сухая масса растения, г	Число бобов	Число семян		Масса семян I растения, г	Масса 1000 семян, г	Окраска семян
					I растения	в бобе			
R 83	106	65,7*	26,1	43,1	37,3	0,85*	10,3	277	Коричневые
R 87	88	61,0	32,4	64,2*	93,1*	1,45	25,0*	269	Темнокоричневые, коричневые, бежевые
R 88	90	58,4	20,2*	55,3	83,0	1,50	24,7	293	Коричневые, бежевые,
R 92	92	54,1	35,3	63,4*	114,0*	1,80*	30,7*	269	Светлокоричневые
R 93	108	67,0*	24,4	51,2	56,3	1,10	20,2	359*	Бежевые
R 95	95	47,9*	30,0	48,1	77,0	1,60*	22,1	288	Темнокоричневые
R 98	97	58,2	31,0	49,1	63,7	1,43	19,7	286	Коричневые
Краснокутский 123	93	57,5	36,0	51,4	68,5	1,33	15,5	233	Темнокоричневые

* Разница с исходным сортом достоверна на 5%-м уровне

при прочих характеристиках на уровне исходного сорта, R92 – высокой семенной продуктивностью, а R93 – позднеспелостью, высокорослостью и крупными семенами. Растения линии R95 были низкорослыми, с повышенным числом семян в бобе. Линия R98 практически не отличалась от контроля Краснокутский 123.

В следующем, 2000 году было изучено III поколение линейных потомств регенеранта R₀ 723 (табл. 36). В неблагоприятных условиях избыточной влажности линии продолжали достоверно отличаться друг от друга и от контроля, но распределение их по сравнению с исходным сортом стало иным. Линии R83 и R87 были сильно угнетены, особенно R83, которая практически не дала семян: две трети бобов оказались пустыми, и большая часть завязавшихся семян была поражена грибной инфекцией.

Линия R88 менее других подверглась избыточному вегетативному росту, отличаясь при этом более активным завязыванием и ростом семян в бобах и как результат – повышенной продуктивно-

Т а б л и ц а 3 6

Изменчивость потомств регенеранта R₀ 723, полученного в культуре семядольного узла нута Краснокутский 123, 2000 г.

Линия R ₃	Веgetационный период	Высота, см	Сухая масса растения, г	Число ветвей I порядка	Число бобов	Число семян		Масса семян I растения, г	% пораженных семян	Масса 1000 семян, г
						I растения	в бобе			
R 83	109	<u>83.1*</u>	27,2	<u>2.3*</u>	<u>9.5*</u>	<u>2.9*</u>	<u>0.35*</u>	<u>0.4*</u>	<u>69*</u>	<u>138</u>
		22		45	77	130	134	143	52	32
R 87	106	<u>88.7</u>	38,8	<u>1.9</u>	<u>23.3*</u>	<u>19.6*</u>	<u>0.72</u>	<u>3.9*</u>	<u>49*</u>	<u>199</u>
		16		46	72	94	44	99	61	38
R 88	108	<u>75.8*</u>	33,2	<u>1.9</u>	<u>33.7</u>	<u>34.8</u>	<u>1.02*</u>	<u>8.5*</u>	<u>40</u>	<u>244*</u>
		8		34	36	42	16	46	59	19
R 92	108	<u>105.9*</u>	51,2	<u>1.7</u>	<u>39.2</u>	<u>31.2</u>	<u>0.77</u>	<u>5.9</u>	<u>39</u>	<u>188</u>
		9		30	47	69	38	61	44	17
R 93	108	<u>89.7</u>	32,4	<u>4.7*</u>	<u>36.8</u>	<u>34.8</u>	<u>0.64</u>	<u>4.6</u>	<u>28</u>	<u>190</u>
		5		21	39	58	30	59	59	11
R 95	107	<u>80.5*</u>	31,2	<u>4.1*</u>	<u>24.1*</u>	<u>23.1</u>	<u>0.95</u>	<u>5.4</u>	<u>46*</u>	<u>234*</u>
		11		24	31	45	30	63	35	20
R 98	107	<u>82.7*</u>	27,2	<u>1.5</u>	<u>37.5</u>	<u>31.6</u>	<u>0.85</u>	<u>7.4</u>	<u>31</u>	<u>234*</u>
		9		46	36	41	19	34	34	11
Краснокутский 123	106	<u>90.5</u>	33,2	<u>1.6</u>	<u>41.4</u>	<u>30.9</u>	<u>0.77</u>	<u>6.5</u>	<u>31</u>	<u>178</u>
		9		44	45	44	23	44	33	14

Примечание: В числителе среднее арифметическое, в знаменателе коэффициент вариации, %; * разница с исходным сортом достоверна на 5%-м уровне

стью и более крупными семенами. Линии R93 и R95 имели повышенную ветвистость, причем вторая сочетала это с малым количеством бобов и крупными семенами. Линия R98 практически не отличалась от исходного сорта, кроме более крупных семян.

Вычисление коэффициентов вариации показало, что все учтенные количественные признаки исходного сорта, за исключением высоты растений и массы 1000 семян, сильно варьировали, однако изменчивость внутри потомств регенеранта была больше (см. табл. 36). Линии различались по степени и спектру повышенной изменчивости: R83 варьировала намного сильнее исходного сорта по высоте и показателям генеративной сферы, R87 – по элементам семенной продуктивности, а R88 была стабильнее исходного сорта по всем признакам, кроме пораженности семян. В линии R92 наблюдалась повышенная изменчивость по количеству и массе семян, в R93 – тоже, но в меньшей степени, при более высокой вариабельности доли пораженных семян. Линия R95 была стабильнее контроля по многим признакам, кроме массы семян, а R98 варьировала на уровне контроля. Таким образом, потомства одного растения-регенеранта не только достоверно отличались от исходного генотипа и между собой, но и продемонстрировали внутренний потенциал изменчивости. Признаки генеративной сферы оказались наиболее вариабельными. С другой стороны, коэффициенты вариации были выше у линий, более других страдавших от повышенной влажности сезона 2000 г. Это является дополнительным подтверждением физиологического различия линий и существования соматоклональной изменчивости по комплексу признаков, определяющих устойчивость нута к дождливой погоде.

Когда семена соматоклонов урожая 1999 г. повторно посеяли в неблагоприятных условиях 2002 г., линия R83 выделилась избыточным вегетативным ростом в ущерб формированию семян, треть которых оказалась пораженной грибными патогенами. Линия R88 при равном числе бобов превосходила ее вдвое по числу семян на растении и в бобе, причем менее 10% семян были покрыты плесенью.

Следующее, IV поколение изучалось в питомниках 2002 и 2003 гг. после отбора растений с долей пораженных семян менее 20 %. В неблагоприятных условиях 2002 г. два образца из линии R93 (6 и 41) и один из R87 (17) имели высокую семенную продуктивность (см. табл. 33, рис. 22). В засушливом 2003 году в потомстве R92 обнаружено одно растение с хлорофилльной мутацией

(пестролистностью), а высокопродуктивным был образец VII-1 из линии R88 (см. табл. 34, рис. 23).

Итак, в наших исследованиях установлено наличие соматклональной изменчивости у потомств регенеранта, полученного в культуре семядольного узла. Линии различались по степени повышения изменчивости, характеру вариаций и имели разные экологические оптимумы, что выразилось в «смене лидеров» по продуктивности в засушливые и дождливые годы. Нестабильность сохранялась как минимум до IV поколения.

* * *

Возделывание нута в Сибири способно значительно улучшить качество питания людей и домашних животных. Для этого необходимы новые высокоурожайные сорта нута, адаптированные к особенностям климата. Наши исследования показали эффективный путь получения с помощью соматклональной изменчивости новых форм нута, отличающихся от исходного сорта Краснокутский 123 повышенной продуктивностью, устойчивостью к патогенам, скороспелостью, экологической стабильностью и улучшенными показателями качества зерна.

Мы убедились, что соматклональная изменчивость нута, как и сои, увеличивает фенотипическое разнообразие исходного генотипа путем появления симметрично распределенных вариаций, если в истории исходного сорта отсутствует селекция по данному признаку. Частота встречаемости желательных соматклональных вариаций и величина сдвига показывают обратную зависимость от силы давления предварительного отбора. Поэтому только единичные соматклоны нута превосходили исходный сорт по устойчивости к аскохитозу.

Широкий спектр и достаточно высокая частота соматклональных вариаций по хозяйственным признакам позволяют вести отбор нужных генотипов при разных селективных условиях. Сохранение и расширение изменчивости у нескольких поколений соматклонов ведет к увеличению объемов изучаемого материала в самых широких пределах при ограниченном первоначальном количестве регенерантов R_0 .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Актуальные направления селекции сои и нута для условий Сибири – создание скороспелых, высокопродуктивных сортов, устойчивых к гидротермическим стрессам и основным патогенам, с высоким качеством продукции. Наши исследования показали, что соматоклональная изменчивость в сочетании с отбором способствует получению форм с хозяйственно ценными признаками по актуальным направлениям селекции.

Изучение фенотипических характеристик семи поколений линейных потомств регенерантов сои, полученных из тканей семядолей и семядольных узлов проростков сорта СибНИИК 315, продемонстрировало наличие соматоклональной изменчивости, позволяющей проводить отбор селекционного материала. Соматоклоны имели достоверные различия по морфометрическим, физиологическим и биохимическим признакам и архитектонике генеративной сферы. Выделены перспективные линии, стабильно превосходящие исходный сорт по семенной продуктивности, не уступая ему в скороспелости.

У потомств растений-регенерантов нута, изученных в четырех самоопыленных поколениях, выявлено значительное разнообразие особенностей роста и формирования вегетативных и генеративных органов в разных погодных условиях. Отобраны линии с повышенной устойчивостью к аскохитозу и фузариозу, значительно превосходящие исходный сорт Краснокутский 123 по семенной продуктивности в годы, неблагоприятные для генеративной функции нута.

Вариации признаков соматоклонов в полевых условиях обеспечиваются влиянием по меньшей мере трех источников изменчивости, не считая случайных факторов.

Во-первых, количественная изменчивость является следствием соматоклональных вариаций, которые возникают в период недифференцированного роста *in vitro*. На этом этапе, когда ткани и клетки переходят к «анархическому, неорганизованному размножению» (Бутенко, 1975), клеточный геном особо чувствителен к действию внешних сигналов – биологически активных веществ в составе питательных сред и других факторов. Полученные нарушения представляют собой генные и хромосомные мутации, наследуемые и ненаследуемые эпигенетические изменения (Karp, 1995).

Во-вторых, источником вариабельности может быть переопределение генетических формул количественных признаков растений, которые детерминируются спектром генов (Драгавцев, 1995).

В-третьих, адаптивные вариации признаков также могут быть источником изменчивости. В последние десятилетия обнаружено много доказательств нестабильности генома под действием внешних факторов (Жученко, 2001; Голубовский, 2001). Предполагается, что живые системы обладают оперативной памятью, которая находится в непрерывном контакте со средой. Адаптивные генетические изменения происходят за счет мобилизации факультативных элементов генома (ДНК- и РНК-носителей) – природных генноинженерных систем с обратными связями.

Размышляя о причинах возникновения соматклонов, устойчивых к биотическим и абиотическим факторам среды, можно предположить, что растения-регенеранты в процессе возникновения и развития проходят отбор на неспецифическую устойчивость к стрессам. Понятие регенерации в широком смысле обозначает, по мнению ряда известных ученых, базовую способность организма восстанавливать себя после повреждающих и уничтожающих внешних воздействий, в том числе травм, патологических поражений и заболеваний. Регенерация осуществляется путем заживления ран, формирования адвентивных органов, активизации вегетативного и генеративного размножения, а также иммунитета (Дарвин, 1896; Кренке, 1950; Лиознер, 1982). Регенерация высших растений *in vitro* рассматривается как элемент онтогенетической адаптации, способность «начать все заново» (Лутова, 1993).

Связь между регенерационной способностью и иммунитетом растений означает, что генотипы, способные после глубокого экспериментального воздействия в условиях *in vitro* восстанавливаться из изолированных тканей и клеток, могут обладать повышенной устойчивостью к повреждающим факторам патогенов.

Проведенные исследования показали, что соматклональная изменчивость культурных растений, реализованная в виде количественных вариаций, имеет следующие свойства:

- Как правило, она увеличивает дисперсию признака путем появления вариаций, распределенных симметрично относительно параметра исходного генотипа, если он ранее не подвергался отбору по данному признаку.

- Чем успешнее была селекционная работа над исходным сортом в каком-либо направлении, тем меньше частота встречаемости соматональных вариаций, сдвигающих значения признака в том же направлении, и меньше величина сдвига. Поэтому только единичные соматоналы сои превосходили исходный сорт – по скороспелости, нута – по устойчивости к аскохитозу.

- Соматональная изменчивость содействует появлению доминантных признаков, свойственных диким родичам культурных растений. Так среди соматоналов сои появились формы с мелкими семенами, с длинными, тонкими, вьющимися и стелющимся стеблями индетерминантного типа, резко отличающиеся от исходного сорта с крупными семенами и жесткими неполегающими стеблями промежуточного типа роста.

- Соматоналы сои по сравнению с индуцированными мутантами имеют меньшую долю негативных (снижающих коэффициент размножения) вариаций и увеличенную частоту позитивных адаптационных изменений, повышающих экологическую стабильность.

Для использования соматональной изменчивости сои и нута в практической селекции следует применять метод педигри и действовать согласно схеме индивидуального отбора у самоопылителей. Поскольку в поколениях R_0 и R_1 фенотипы растений могут находиться под модифицирующим влиянием условий *in vitro*, а соматональные вариации часто проявляются в более поздних поколениях, не рекомендуется начинать отбор ранее, чем в поколении R_3 . Для этого необходимо:

1. Провести индивидуальный отбор растений с нужными признаками;
2. Посеять семена отобранных растений на отдельных делянках;
3. Провести оценку линий по хозяйственным признакам с помощью адекватных статистических критериев различия средних;
4. Выделить перспективные линии и отобрать лучшие растения;
5. Повторять отбор в каждом поколении до стабилизации хозяйственных признаков.

ЛИТЕРАТУРА

Abbo S., Crusak M.A., Tzuk T., Reifen R. Genetic control of seed weight and calcium concentration in chickpea seed // *Plant Breed.*, 2000. – 119, N 5. – P. 427 – 431.

Altaf N., Ahmad M.S. Plant regeneration and propagation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) through tissue culture techniques / IAEA, Vienna, 1986a. – P. 407 – 417.

Altaf N., Ahmad M.S. Callusing and regeneration response of various chickpea genotypes / PAEC-KfK Symposium: Workshop on biotechnology in agriculture and energy. (March 3 – 7, 1986) – NIAB, Faisalabad, 1986b.

Altaf N., Ahmad M.S. Chickpea (*Cicer arietinum* L.) / *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 10. Legumes and Oilseed Crops I. – Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1990. – P. 100 – 113.

Anil D., Noel E. T. H. Deleted forms of plastid DNA in albino plants from cereal anther culture // *Curr. Genet.*, 1985. – 9, N 8. – P. 671 – 678.

Armstrong C.L., Phillips R.L. Genetic and cytogenetic variation in plant regenerated from organogenic and friable embryogenic tissue cultures of maize // *Crop Sci.*, 1988. – 28. – P. 363 – 369.

Bajaj Y.P.S. Freeze preservation of meristems of *Arachis hypogaea* and *Cicer arietinum* // *Indian J Exp Biol*, 1979. – 17. – P. 1405 – 1407.

Bajaj Y.P.S. Production of normal seeds from plants regenerated from the meristems of *Arachis hypogaea* and *Cicer arietinum* cryopreserved for 20 months // *Euphytica*, 1983. – 32. – P. 425 – 430.

Bajaj Y.P.S., Dhanju M.S. Regeneration of plants from apical meristem tips of some legumes. // *Curr Sci*, 1979. – 48. – P. 906 – 907.

Bajaj Y.P.S., Gosal S.S. Pollen embryogenesis and chromosomal variation in cultured anthers of chickpea. // *Chickpea Newslett*, 1987. – 17. – P. 12 – 13.

Baker C.M., Carter C.D. Regeneration and transformation of soybean from mature seeds: Abstr World Congr. in vitro Biol., San Francisco, Calif., June 22 – 27, 1996 // *In vitro Cell and Dev. Biol. Anim.*, 1996. – 32, N 3, 2.

Banerjee-Chattopadhyay S., Schwemmin A.M., Schwemmin D.J. A study of karyotypes and their alteration in cultured and *Agrobacterium* transformed roots of *Lycopersicon peruvianum* Mill. // *Theor. and Appl. Genet.*, 1985. – 71. – P. 1258 – 1262.

Barg R., Umiel N. Selection for herbicide resistance in tissue culture and phenotypic variation among the resistant mutant // *Plant Sci*, 1985. – 41. – P. 337 – 345.

Barvale U.B., Widholm J.M. Soybean: Plant regeneration and Somaclonal Variation / *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol.10. Legumes and Oilseed Crops I. (ed. by Y.P.S. Bajaj). – Berlin-Heidelberg: Springer Verlag, 1990. – P. 114 – 133.

Barvale U.B., Meyer M.M., Widholm J.M. Screening of *Glycine max* (L.) Merr. and *G. soja* Sieb. and Zucc. genotypes for multiple shoot formation at the cotyledonary node // *Theor and Appl Genet.*, 1986a. – 72. – P. 423 – 428.

Barvale U.B., Kerns H.A., Widholm J.M. Plant regeneration from callus cultures of several soybean genotypes via embryogenesis and organogenesis // *Planta*, 1986b. – 167 – P. 473 – 480.

Barvale U.B., Widholm J.M. Somaclonal variation in plants regenerated from cultures of soybean // *Plant Cell Rep*, 1987. – 6. – P. 365 – 368.

Beilinson V., Chen Z., Shoemaker R.C. et al. Genomic organization of glycinin gene in soybean // *Theor and Appl Genet*, 2002. – 104, N 6-7. – P. 1132 – 1140.

Binding H., Nehls R., Schieder O. et al. Regeneration of mesophyll protoplasts isolated from dihaploid clones of *Solanum tuberosum* // *Physiol. plant.*, 1978. – 43. – P. 52 – 54.

Binns A., Meins P. J. Evidence that habituation of tobacco pith cell division promoting factors is heritable and potentially reversible // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973. – 70. – P. 2660 – 2662.

Bishimbayeva N.K. A role for apoptosis and polysaccharide secretion in the long-term somatic embryogenesis of cereals // *Bull. of the State Nikitski Bot. Gardens*, 2002. – N 86. – P. 19 – 22.

Brettell R. I. S., Goddard B. V. D., Ingram D. S. Selection of Tms-cytoplasm maize tissue cultures resistant to *Drechslera maydis* T-toxin // *Maydica*, 1979. – 24. – P. 203 – 213.

Brettell R. I. S., Thomas E., Ingram D. S. Reversion of Texas malesterile cytoplasm maize in culture to give fertile, T-toxin resistant plants // *Theor. and Appl. Genet.*, 1980. – 58, N 2. – P. 55 – 58.

Brettell R. I. S., Pallotta M. A., Gustafson J. P., Appels R. Variation at the Nor loci in triticale derived from tissue culture // *Theor. and Appl. Genet.*, 1986. – 71, N 4. – P. 637 – 643.

Buiatti M. Use of cell and tissue cultures for mutation breeding // *Votr. Pflanzenzüchtg.*, 1989. – 16. – P. 179 – 200.

Burmeister G., Hosel W. Comparison of P-glycosidases from *Cicer arietinum* L. cell culture and whole seedlings // *Planta Med*, 1980. – 4. – P. 40 – 48.

Buvat R. Recherches sur la dedifferentiation des cellules vegetales // *Ann. Sci. Nat. Bot.*, 1944. – 5. – P. 1 – 130.

Byth O.E., Green J.M., Hawtin G.C. ICRISAT / ICARDA chickpea breeding strategies / *Proc Int Workshop Chickpea Improv*, Hyderabad, India 28 Feb-2 March, 1979. – ICRISAT, 1980. – P. 11 – 22.

Carpentieri-Pipolo Y., Pipolo A.E., da Silva F.A.V., Petek M.R. Soybean parent selection based on genetic diversity // *Braz. Arch. Bid. And Technol*, 2000. – 43, N3. – P. 295 – 300.

Cary T. R., Nickell C. D. Genetic analyses of a short-petiole-type soybeans, LN89-350ZTP // *J. Hered.*, 1999. – 90, N2 – P. 300 – 301.

Chaleff R.S. Variants and mutants / *Genetics of Higher Plants. Applications of Cell Culture.* – Cambridge: Cambridge Univ. press, 1981. – P. 41 – 96.

Chaudhary B.D., Singh D.P., Singh P. Inter-relationship between morphophysiological characters and seed yield in chickpea genotypes under irrigated field conditions // *Haryana Agr. Univ. F. Res.*, 1992. – 22, N 2. – P. 91 – 96.

Chazi T.D., Cheema H.V., Nabors M.W. Somatic embryogenesis and plant regeneration from embryogenic callus of soybean, *Glycine max* L. // *Plant Cell Rep*, 1986. – 5. – P. 452–456.

Cheng T.Y., Saka H., Voqui-Dinh T.H. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture. // *Plant Sci Lett*, 1980. – 19. – P. 91 – 99.

Christianson M.L., Warnick D.A., Carlson P.S. A morphogenetically competent soybean suspension culture // *Science*, 1983a. – 222. – P. 632 – 634.

Christianson M.L., Warnick D.A., Carlson P.S. A morphogenetically competent conditioned medium to alleviate the reduced nitrogen requirement of soybean cells grown in suspension cultures // *Planta*, 1983b. – 105. – P. 25 – 32.

Cooper D. B., Sears R. G., Lookhart G. L., Jones B. L. Heritable somaclonal variation in gliadin proteins of wheat plants derived from immature embryo callus culture // *Theor. and Appl. Genet.*, 1986. – 71, N 6. – P. 784 – 790.

Croser J.S., Ahmad F., Clarke H., Siddique K.H.M. Utilization of *Cicer* in chickpeas improvement – progress, constraints and prospects // *Austral. J. Agr. Res.* – 2003. – 54, № 5. – P. 429 – 444.

Dale P.J., Irvin J.A., Scheffler J.A. The experimental and commercial release of transgenic crop plants // *Plant Breeding*, 1993. – 111, N 1. – P. 1 – 22.

D'Amato F. Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants / *Frontiers of plant tissue culture*, 1978, Calgary : IAPTC, 1978. – P. 287 – 295.

D'Amato F. Nuclear cytology of tissue cultures / *Plant Tissue and Cell Culture, Application to Crop Improvement: Proc. Int. Symp. Olomouc, Czechoslovakia, Sept. 24-29, 1984.* – Prague, 1984. – P. 295 – 303.

D'Amato F. Cytogenetics of plant cell and tissue cultures and their regenerates / *CRC Critical Reviews in Plant Sciences*, 1985. – 3. – P. 73 – 112.

Daub M.E. A cell culture approach for the development of disease resistance studies on phytotoxin cercosporin // *Hort Sci*, 1984. – 19, N 3. – P. 18 – 23.

Day A., Ellis T.H.N. Chloroplast DNA deletions associated with wheat plants regenerated from pollen: possible basis for maternal inheritance of chloroplasts // *Cell*, 1984. – 39. – P. 359 – 368.

Dan Y., Reichert N.A. Soybean transformation and regeneration methods: Pat. 5968830 USA, МПК⁶ C12N 5/10, C12N 15/82 / Mississippi State University. – N08 / 825469. – Заявл. 28.03.97; Опубл. 19.10.99; НПК 435/469.

Davis T.M., Foster K.W. A method for rooting chickpea cuttings // *Int Chickpea Newslett*, 1982. – 7. – P. 6 – 8.

Deambrogio E., Dale P. I. Effect of 2,4-D on the frequency of regenerated plants in barley (*Hordeum vulgare*) cultivar "Akka" and genetic variability between them // *Cereal Res. Commun.*, 1980. – 8. – P. 417 – 424.

De Klerk G.I. How to measure somaclonal variation // *Acta bot. neerl.*, 1990. – 39, N 2. – P. 129 – 144.

Demarly Y. Experimental and theoretical approach of in vitro variations / *Somaclonal variation and crop improvement.* (Ed. J. Semal). – Dordrecht: Nijhoff, 1986. – P.84 – 99.

Donn G., Tischer E., Smith J. A., Goodman H. M. Herbicide-resistant alfalfa cells: an example of gene amplification in plants // *J. Mol. Appl. Genet.*, 1984. – 2, N 6. – P. 621 – 635.

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

Evans D. A. Genetic basis of somaclonal variation in tomato // *Plant Tissue and Cell Culture Application to Crop Improvement: Proc. Int. Symp. Olomouc, Czechoslovakia, Sept. 24-29, 1984.* – Prague, 1984. – P. 259 – 265.

Evans D. A., Gamborg O. L. Chromosome stability of cell suspension culture of *Nicotiana* spp. // *Plant Cell Reports*, 1982. – 1. – P. 104 – 107.

Evans D. A., Sharp W. R. Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture // *Science*, 1983. – 221. – P. 949 – 951.

Falco S.C., Guida T., Locke M. et al. Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine // *Bio/Technology*, 1995. – 13, N 6. – P. 577 – 582.

Fontana G.S., Santini L., Caretto S., Frugis G., Mariotti D. Genetic transformation in the grain legume *Cicer arietinum* L.(chickpea) // Plant Cell Rep, 1993. – 12. – P. 194 – 198.

Fraley R.T. The contribution of plant biotechnology to agriculture in the coming Decades, in biosafety for sustainable agriculture / ISAAA (Ithaca) and Stockholm Environment Institute. – Stockholm, Sweden, 1994. – P. 3 – 28.

Frolova L. V., Shamina Z. B., Ponert J. Artificial reduction of the chromosome number in plant cell population in vitro // Plant tissue and cell culture application to crop improvement: Proc. of the Int. symp. Olomouc, Czechoslovakia 24-29 Sept., 1984. – Prague: Czech. Acad. of Sci., 1984. – P. 315 – 316.

Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cell // Exp.Cell Res., 1968. – 50. – P. 151 – 158.

Gamborg O.L., Constabel F., Fowke L, et al. Protoplast and cell culture methods in somatic hybridization in higher plants // Can. J. Genet. Cytol., 1974. – 16. – 737 – 750

Gaur P.M., Gaur N.K. Proal- tew leaflets and outwardly curved wings: Two new mutants of chickpea // Plant Breed., 2003. – 122, N 2. – P. 192 – 194.

George L., Eapen S. Thidiazuron-induced shoot organogenesis and plant regeneration in chickpea (*Cicer arietinum* L.) // Plant Tissue Cult., 1999 – 9 (1). – P. 71 – 78.

Gertz J.M., Vencell W.K., Hill N.S. Tolerance of transgenic soybean (*Glycine max*) to heat stress / Brighton Conf “Weds”: Proc. Int. conf. Brighton 15-18 May 1999. – Vol. 3 – Farnham, 1999. – P. 835 – 840.

Gesteira A.S., Otoni W.C., Barros E.G., Moreira M.A. RAPD-based detection of genomic instability in soybean plants derived from somatic embryogenesis. // Plant Breed., 2002 – 121, N 3. – P. 269 – 271

Gosal S.S., Bajaj Y.P.S. Establishment of callus tissue cultures, and the induction of organogenesis in some grain legumes // Crop Improv, 1979. – 6 (2). – P. 154 – 160

Gosal S.S., Bajaj Y.P.S. Pollen embryogenesis and chromosomal variation in anther culture of three food legumes – *Cicer arietinum*, *Pisum sativum* and *Vigna mungo* // Sabrao J., 1988. – 20.

Gupta S.N., Dahiya B.S., Malik D.P.S. Response of chickpea to water deficits and drought stress // Naryana Agr. Univ. J. Res., 1995. – 25, N 1-2. – P. 11-19.

Haq M.A., Hassan M. Induced mutations for resistance to *Ascochyta* blight in chickpea // Pak J Agric Sci, 1980. – XVII(3-4) – P. 57 – 64.

Hawtin G.C., Singh K.B. Kabuli-Desi introgression. Problems and prospects / Proc Int Workshop Chickpea Improv, Hyderabad, India 28 Feb-2 March, 1979. – ICRI-SAT, 1979. – P. 51 – 60

Hildebrand D.F., Phillips G.C., Collins G.B. Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). / Biotechnology in agriculture and forestry 2. Crops I. – Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 1986. – P. 283 – 308.

Hitomi A., Amagai H., Ezura H. The influence of auxin type on the array of somaclonal variants generated from somatic embryogenesis of eggplant, *Solanum melongena* L. // Plant breed., 1998. – 117. – P. 379 – 383.

Hosel W., Shaw P.D., Barz W. Über den Abbau von Flavonolen in pflanzlichen Zellsuspensionskulturen // Z. Naturforsch, 1972. – 278. – P. 946 – 954.

Hosel W., Burmeister G., Kreysing P., Surholt E. Enzymological aspects of flavonoid catabolism in plant cell cultures / Barz W. et al. (eds) Plant tissue culture and its biotechnological application. – Springer, Berlin Heidelberg New York, 1977. – P. 172 – 177.

Hosel W., Surholt E., Borgmann E. Characterization of β -glucosidase isoenzymes possibly involved in lignification from chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell suspension cultures // Eur J Biochem, 1978. – 84. – P. 487 – 492.

Huda S., Islam R., Bari M. A. Shoot regeneration in chickpea (*Cicer arietinum* L.) from callus cultures of internode explants // Plant Tissue Cult., 1999. – 9 (2). – P. 107 – 111.

Huda S., Islam R., Bari M. A., Asaduzzaman M. Shoot differentiation from cotyledon derived callus of chickpea (*Cicer arietinum* L.) // Plant Tissue Cult., 2003. – 13 (1). – P. 53 – 59.

Hymowitz T., Chalmers N.L., Costanza S.H., Saam M.M. Plant regeneration from leaf explants of *Glycine glandestina* Wendl. // Plant Cell Rep, 1986. – 3. – P. 192 – 194

Elvers D.R., Palmer R.G., Fehr W.R. Anther culture in soybeans // Crop Sci, 1974. – 14. – P. 891 – 893

Iruela M., Rubio J., Cubero J.J., Gil J., Millan T. Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and JSSP markers // Theor. and Appl Genet., 2002. – 104, N 4 – P. 643 – 651.

Islam R., Farooqui H., Riazuddin S. In vitro genotype-phytohormone interaction in chickpea (*Cicer arietinum* L.) // Plant Tissue Cult., 1998. – 8(1). – P. 173 – 175.

Islam R., Farooqui H., Riazuddin S. In vitro organogenesis of chickpea and its transformation by *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Tissue Cult., 1993. – 3(1). – P. 29 – 34.

Islam R., Riazuddin S. In vitro induction of adventitious roots in chickpea by *Agrobacterium rhizogenes* // Plant Tissue Cult., 1992. – 2(2). – P. 135 – 137.

Islam R., Riazuddin S., Farooqui H. Clonal propagation from seedling nodes and shoot apices of chickpea (*Cicer arietinum* L.) // Plant Tissue Cult., 1995. – 5(1). – P. 53 – 57.

Jin W., Horner H.T. Palmer R.G., Shoemaker R.C. Analysis and mapping of gene families encoding β -1,3-glucanases of soybean // Genetics (USA), 1999. – 153, N 1. – P.445 – 452.

Kameya T., Widholm J.M. Plant regeneration from hypocotyl sections of *Glycine* species // Plant Sci Lett, 1981. – 21. – P. 289 – 294.

Kao K.N., Keller W.A., Miller R.A. Cell division in newly formed cells from protoplasts of soybean, // Exp Cell Res, 1970. – 62. – P. 338 – 340.

Karp A. Somaclonal variation as a tool for crop improvement // Euphytica, 1995. – 85. – P. 295 – 302.

Karp A., Bright S.W.J. On the causes and origins of somaclonal variation // Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol., 1985. – 2. – P. 199 – 234.

Kartha K.K., Pahl K., Leung N.L., Mroginski L.A. Plant regeneration from meristem of grain legumes: soybean, cowpea, peanut, chickpea and bean // Can J Bot, 1981. – 59. – P. 1671 – 1679

Kemble R. J., Flavell R. B., Brettell R.I.S. Mitochondrial DNA analyses of fertile and sterile maize plants derived from tissue culture with the Texas male sterile cytoplasm // Theor. and Appl. Genet., 1982. – 62. – N 3. – P. 213 – 217.

Kemble R. J., Shepard J. F. Cytoplasmic DNA variation in a potato protoclonal population // Theor. and Appl. Genet. – 1984. – 69, N 2. – P. 211 – 216.

Khan S.K., Ghosh P.D. In vitro induction of androgenesis and organogenesis in *Cicer arietinum* L. // Curr. Sci, 1983. – 52 (18). – P. 891 – 893.

Khan S.K., Ghosh P.D. Plantlet regeneration from cotyledonary nodes of chickpea // Int Chickpea Newslett, 1984. – 11. – P. 22 – 24

- Landsmann J., Uhrig H.* Somaclonal variation in *Solanum tuberosum* detected at the molecular level // *Theor. and Appl. Genet.* – 1985. – 71, N 3. – P. 500 – 505.
- Ladizinsky G., Adler A.* The origin of chickpea *Cicer arietinum* L. // *Euphytica*, 1976a. – 25. – P. 211 – 217.
- Ladizinsky G., Adler A.* Genetic relationships among the annual species of *Cicer arietinum* L. // *Theor Appl Genet*, 1976b. – 48. – P. 197 – 203.
- Larkin P.J., Scowcroft W.R.* Somaclonal variation – a novel source of variability from cell culture for plant improvement // *Theor. and Appl. Genet.*, 1981. – 60, N.1. – P. 197 – 214.
- Larkin P. J., Ryan S. A., Brettell R. I. S., Scowcroft W. R.* Heritable somaclonal variation in wheat // *Theor. and Appl. Genet.*, 1984. – 67, N 5. – P. 443 – 455.
- Larkin P. J., Scowcroft W. R.* Somaclonal variation: a new option for plant improvement // *Plant improvement and somatic cell genetics.* – Orlando etc.: Acad. press, 1983. – P. 159 – 178.
- Lazzeri P.A., Hildebrand D.F., Collins G.B.* A procedure for plant regeneration from immature cotyledon tissue of soybean // *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1985. – 3. – P. 160 – 167.
- Lee M., Phillips R.L.* The chromosomal basis of somaclonal variation // *Ann. Rev. Plant Physiol., Plant Mol. Biol.*, 1988. – 39. – P. 413 – 437.
- Li B.J., Langridge W.H.R., Szalay A.A.* Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in soybean *Glycine max* // *Plant Cell Rep*, 1985. – 4. – P. 344 – 347.
- Lörz H., Scowcroft W. R.* Variability among plants and their progeny regenerated from protoplasts of Su/su heterozygotes of *Nicotiana tabacum* // *Theor. and Appl. Genet.*, – 1983. – 66, N 1. – P. 67 – 75.
- Lörz H., Brown P. T. H.* Variability in tissue culture derived plants – possible origins; advantages and drawbacks // *Genetic Manipulation in Plant Breeding.* – Berlin ; New York: Walter de Gruyter Co., 1986. – P. 513 – 534.
- Lourens A. G., Martin F.A.* Evaluation of in vitro propagated sugarcane hybrids for somaclonal variation // *Crop Sci.*, 1987. 27. P. – 793 – 796.
- Ludwig A., Tenhaken R.* Defense gene expression in soybean is linked the status of the cell death program // *Plant Mol. Boil.*, 2000. – 44, N2. – P. 209 – 218.
- Ma G., Chen P., Puss G.R., Tolin S.A.* Genetic study of a lethal necrosis to soybean mosaic virus in PJ507389 soybean // *J. Hered.*, 2003. – 94, N3. – P. 205 – 211.
- Malhotra R.S., Singh K.B.* Natural cross pollination in chickpea // *Int Chickpea Newslett*, 1986. – 14. – P.4 – 5
- Malik B.A., Syed A.H., Haqqani A.M., Chaudhury A.H.* Floral biology and yield in chickpea (*Cicer arietinum* L.) // *Pak J Agric Res*, 1982. – 3 (1). – P.1 – 5
- Mamdackar A.P., Koundal K.R.* Construction and screening of subgenomic library of chickpea (*Cicer arietinum* L.) for legumin genes and their analysis // *Indian J. Exp. Biol.*, 1996. – 34, N 6, – P. 496 – 501.
- Manjaya J.G., Pawar S.E.* New genes for resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] and their inheritance // *Euphytica*, 1999. – 106, N 3. – P.205 – 208.
- McCoy T. J., Phillips R. L., Rines H. W.* Cytogenetic analysis of plants regenerated from oat (*Avena sativa*) tissue cultures; High frequency of partial chromosome loss // *Can. J. Genet. and Cytol.*, 1982. – 24. – P. 37 – 50.
- Meesang N., Rananikharachi S.L., Petersen M.L., Andersen S.B.* Soybean cultivars identification and genetic purity analysis using microsatellite DNA markers // *Seed Sci and Technol.*, 2001. – 29, N 3. – P. 637 – 645.

Melnyk V.M., Spiridonova K.V., Andreev I.O. et al. Rearrangements of the 18S-25S ribosomal RNA nuclear gene in culture in vitro of some *Gentiana L.* species // Bull. of the State Nikitski Bot. Gardens, 2002. – N 86. – P. 63 – 66.

Metakovskiy E. V., Akhmedov M. G., Sozinov A. A. Genetic analysis of gliadin-encoding genes reveals gene clusters as well as single remote genes // Theor. and Appl. Genet., 1986. – 73, N 2. – P. 278 – 285.

Miller S. A., Williams G. R., Medina-Filho H., Evans D. A. A somaclonal variant of tomato resistant to race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* // Phytopathology., 1985. – 75. – P. 1354.

Mitra J., Mapes M. O., Steward F. C. Growth and organized development of cultured cells. 4. The behaviour of the nucleus // Amer. J. Bot., 1960. – 47, N 5. – P. 357 – 368.

Moreno M.T., Cubero J.I. Variation in *Cicer arietinum L.* // Euphytica, 1978. – 27. – P. 465 – 485.

Mott R.L., Cordts J.M., Larson A.M. Nitrogen and growth regulator effects on shoot and root growth of soybean in vitro / Plant Tissue Cult Meet., – Knoxville, – Tenn 1984.

Muhle E., Hosel W., Barz W. Catabolism of flavonol glycosides in plant cell suspension cultures // Phytochemistry, 1976. – 15. – P.1669 – 1972

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiol. plant., 1962. – Vol.15. – P. 473 – 497.

Murashige T., Nakano R. Tissue culture as a potential tool in obtaining polyploid plants // J. Hered., 1966. – 57. – P. 114 – 118.

Naylor A. W., Sander G., Skoog F. Mitosis and cell enlargement without cell division in excised tobacco pith tissue // Physiol. Plant., 1954. – 7. – P. 25 – 29.

Neelam A., Reddy C.S., Reddy G.M. Growth and differentiation in tissue cultures of *Cicer arietinum L.* // Int Chickpea Newslett, 1986 a. – 14. – P.9 – 12

Neelam A., Reddy C.S., Reddy G.M. Plantlet regeneration from callus cultures of *Cicer arietinum L.* // Int Chickpea Newslett, 1986b. – 14. – P.12 – 13

Nene Y.L., Haware M.P. Screening chickpea for resistance to wilt // Plant Dis, 1980. – 64. – P.379 – 380.

Nimbalkar R.D., Harer P.N. Genetic diversity in chickpea // J. Maharashtra Agr Univ, 2001. – 26, N1 – P.106 – 107.

Ogihara Y. Tissue culture in *Haworthia*. 4. Genetic characterization of plants regenerated from callus // Theor. and Appl. Genet., 1981. – 60, N 6. – P. 353 – 363.

Oono K. In vitro methods applied to rice / Plant tissue culture. Methods and applications in agriculture. – New York: Acad. press, 1981. – P. 273 – 298.

Oono K. Putative homozygous mutation in regenerated plants of rice // Mol. And Gen. Genet., 1985. – 198, N 3. – P. 377 – 384.

Orton T. J. Chromosomal variability in tissue culture and regenerated plants of *Hordeum* // Theor. and Appl. Genet., 1980. – 56, N 3. – P. 101 – 112.

Orton T.J. Genetic variation in somatic tissue: method or madness? // Adv. Plant Path., 1984. – 2. – P.153 – 185.

Ozias-Akins P., Tabaeizadeh Z., Pring D.R., Vasil I.K. Preferential amplification of mitochondrial DNA fragments in somatic hybrids of the Gramineae // Curr. Genet., 1988. – 13. – P. 241 – 245.

Pavlina R. The effect of 2,4-D and kinetin on soybean callus culture // Acta bot. craat, 1986. – 45. – P. 63 – 70.

Pennel R.I., Janniche L., Scofield G.N., Booij H., de Vries S.C., Roberts K. Identification of transitional cell state in the developmental pathway to carrot somatic embryogenesis // J. Cell Biol., 1992. – 119. – P. 1371 – 1380.

Phillips G.C., Collins G.B. Induction and development of somatic embryos from suspension cultures of soybean // *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 1981. – 1. – P. 123 – 129.

Piffer G.E.G., Di Mauro A.O., Pessoa da Gruz Centurion M.A. Genetics of resistance to powdery mildew (*Microsphaera diffusa*) in Brazilian soybean populations // *Genet. and Mol. Biol.*, 2002. – 25, N3. – P. 339 – 342.

Plader W., Malepszy S., Burza W., Rusinowski Z. The relationship between the regeneration system and genetic variability in the cucumber (*Cucumis sativus* L.) // *Euphytica*, 1998. – 103. – P. 9 – 15.

Polacco J.C., Judd A.K., Dybing J.K., Cianzio S.R. A new mutant class of soybean lacks urease in leaves but not in leaf-derived callus or in roots // *Mol. and Gen. Genet.*, 1989. – 217, N 2-3. – P. 257 – 262.

Rahman S. M., Kinoshita T., Anai T., Takadi X. Genetic relationships between loci for palmitate contents in soybean mutants // *J. Hered.*, 1999. – 90, N3. – P. 423 – 428.

Rahman S. M., Takagi Y., Kubota K., Miyamoto K., Kawakita T. High oleic acid mutant in soybean induced by X-ray irradiation // *Biosci., Biotechnol. and Biochem.*, 1994. – 58, N 6. – P. 1070 – 1072.

Rajoli S.K., Patil J.G., Pumbre A.B. Genotypic correlation and path analysis under three environments in chickpea // *J. Maharashtra Agr. Univ.*, 1997. – 22, N 1. – P. 123 – 124.

Ranch J.P., Oglesby L., Zielinski A.C. Plant regeneration from embryo-derived tissue cultures of soybeans // *In Vitro*, 1985. – 21. – P. 653 – 658.

Ranch J.P., Oglesby L., Zielinski A.C. Plant regeneration from tissue cultures of soybean by somatic embryogenesis / Vasil I (ed). *Plant regeneration and genetic variability. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, 1986. – V. 3. – Academic Press, Orlando. – P. 97 – 110.

Reisch B. Genetic variability in regenerated plants / *Handbook of plant cell culture. Vol. 1.* – New York; London: Macmillan, 1983. — P. 748 – 769.

Rheenen H.A, van, Pundir R.P.S., Miranda J.H. How to accelerate the genetic improvement of a recalcitrant crop species such as chickpea // *Curr. Sci. (India)*, 1993. – 65, N 5. – P. 414 – 417.

Roth J., Lark K.G., Palmer R.G. Use of tissue culture as a tool in soybean improvement / *Progr. and abstrs world soybean res. conf.* – Jowa, Aug. 12 -17, 1984. – Ames (Jowa), 1984. – P.32.

Rozhanskaya O.A. Quantitative somaclonal variation of sainfoin *Onobrychis arenaria* (Kit.)DC // *Bull. of the State Nikitski Bot. Gardens*, 2002. – N 86. – P. 27 – 31.

Rubio J., Haij-Moussa E., Kharrat M.T., Millan T., Gil J. Two genes and linked RAPD markers involved in resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris* race 0 in chickpea // *Plant Breed.*, 2003. – 120, N2. – P.188–191.

Rumar J., van Rheenen N.A. A major gene for time of flowering in chickpea // *J. Hered.*, 2000. – 91, N 1. – P. 67 – 68.

Sacristan M. D., Melchers G. The cytological analysis of plants generated from tumorous and other callus cultures of tobacco // *Mol. and Gen. Genet.*, 1969. – 105. – P. 317 – 333.

Sagare A.P., Suhasini K., Krishnamurthy K.V. Histology of somatic embryo initiation and development in chickpea (*Cicer arietinum*) // *Plant Sci*, 1995. – 109, N1. – P. 87 – 93.

Saka H., Voqui-Dinh T.H., Cheng T.Y. Stimulation of multiple shoot formation on soybean stem nodes in culture // *Plant Sci Lett.*, 1980. – 19. – P. 193 – 201.

Sarker R. H., Shaikh Tahmina Awal. *In vitro* morphogenesis in chickpea (*Cicer arietinum* L.) // Plant Tissue Cult., 1999. – 9(2). – P. 141 – 150.

Sathe B.V., Shinde S.S., Zadole K.O. Correlation coefficient studies in chickpea // J. Maharashtra Agr. Univ, 1993. – 18., N3 – P. 500.

Skoog F., Miller C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro* / Symp. Soc. Exp. Biol., 1957. – 11. – P. 118 – 131.

Scowcroft W. H., Ryan S. A. Tissue culture and plant breeding / Plant Cell Culture Technology. – Oxford: Blackwell Sci. Publ., 1986. – P. 67 – 95.

Sears H. G., Deckard E. L. Tissue culture variability in wheat: callus induction and plant regeneration // Crop Sci., 1982. – 22. – P. 546 – 550.

Shamina Z. B. Cytogenetic study of tissue culture of *Haplopappus gracilis* / Proc. Symp. on the Mutational Process. Mechanism of mutation and inducing factors. – Prague: Academia, 1966. – P. 377 – 380.

Shepard J. F., Bidney D., Shanin E. Potato protoplasts in crop improvement // Science., 1980. – 208, N 4439. – P. 17 – 24.

Sibi M. Genetic program in higher plants. 2. Experimental aspect. Production of variants by *in vitro* tissue culture of *Lactuca sativa* L. increase in vigor in out-crosses // Ann. amelior. plant., 1976. – 26. – P. 523 – 547.

Singh R.J., Hymowitz T. Soybean genetic resources and crop improvement // Genome, 1999. – 42, N4. – P. 605 – 616.

Singh R.J., Hymowitz T. The genomic relationship between *Glycine max* (L.) Merr. and *Glycine soja* Sieb. and Zucc. As revealed by pachytene chromosome analysis // Theor. Appl. Genet., 1988. – 76. – N 5. – P. 705 – 711.

Singh R.P., Singh B.D. Recovery of rare interspecific hybrids of gram *Cicer arietinum* x *C. cuneatum* L. through tissue culture // Curr Sci (India), 1989. – 58, N15. – P. 874 – 876.

Singh K.B., Hawtin G.C., Nene Y.L., Reddy M.V. Resistance in chickpea to *Ascochyta rabiei* // Plant Dis, 1981. – 65. – P. 586 – 587.

Singh R.P., Singh B.D., Jaiswal H.K., Singh R.M., Singh R.B. Organogenesis in callus cultures of chickpea // Indian J Agric Sci, 1982. – 52(2). – P. 86 – 90.

Sinha R.R., Das K., Sen S.K. Nutritional requirement of tissue cultures of some tropical legume crops // Indian J Exp Biol, 1983. – 21. – P. 113 – 119.

Sivolap Y.M. Molecular-genetic polymorphism investigation for genetic resources estimation / Biotechnology Approaches for Exploitation and Preservation of Plant Resources: Abstr. of Intern. Symp. 26-31 May 2002 (Yalta, Ukraine) – Yalta, 2002. – P. 7 – 8.

Skirvin H. M., Janick J. Tissue culture-induced variation in scented *Pelargonium* spp. // J. Amer. Soc. Hort. Sci., 1976. – 101. – P. 281 – 290.

Spehar C.R., Soura L.A.C. Selecting soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) tolerant to low-Calcium stress in short term hydroponics experiment // Euphytica, 1999. – 106, N1. – P. 35 – 38.

Sree Ramulu K., Dijkhuis P., Roest S. Phenotypic variation and ploidy level of plants regenerated of protoplasts of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L. cv. "Bintje") // Theor. and Appl. Genet., 1983. – 65. – P. 329 – 338.

Sree Ramulu K., Dijkhuis P., Roest S. Genetic instability in protoclones of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. "Bintje"): new types of variation after vegetative propagation // Theor. and Appl. Genet., 1984a. – 68, N 6. – P. 515 – 519.

Sree Ramulu K., Dijkhuis P., Bokelmann G.S., de Groet B. Early occurrence of genetic instability in protoplast culture of potato // Plant Sci Lett., 1984b. – 36. – P. 79 – 86.

Takebe I., Labib G., Melchers G. Regeneration of whole plants from isolated protoplasts of tobacco // *Naturwissenschaften*, 1971. – 58. – P. 318 – 320.

Taregyan M.R., Mortimer A.M., Putwain P.D., Collin H.A. Selection for resistance to the herbicide imazethapyr in somaclones of soybean // *Weed Res.*, 2001. – 41, N 2. – P. 143 – 154.

Tekeoglu M., Rauesh P.N., Muchbower F.J. Integration of sequence tagged microsatellite sites to the chickpea genetic map // *Theor and Appl. Genet.*, 2002. – 105., N 6-7. – P. 847 – 854.

Thomas E., Bright B. W. J., Franklin J. et al. Variation amongst protoplast-derived potato plants (*Solanum tuberosum* cv. "Maris Bard") // *Theor and Appl. Genet.*, 1982. – 62. – P. 65 – 68.

Thorpe T. A. Physiological and biochemical aspects of organogenesis in vitro / *Frontiers of plant tissue culture*. – Ed. T. A. Thorpe. – Calgary: IAPTC, 1978. – P. 49 – 58.

Tsukamoto P., Kukuchi A., Harada K., Kitamura K., Okubo K. Genetic and chemical polymorphism of saponins in soybean seed / 15-th Int Bot Congr Yokogama, Aug. 28 - Sept. 3, 1993: Abstr. – Yokogama, 1993. – P. 529.

Tullu A., Kaiser W.J., Kraft J.M., Muehlbauer F.J. A second gene for resistance to race 4 of fusarium wilt in chickpea and linkage with a RAPD marker // *Euphytica*, 1999. – 109, N 1. – P. 43 – 50.

Turano M.J., Baird L.M., Webster B.D. Characteristics of the stigma of chickpea // *Crop Sci*, 1983. – 23. – P. 1033 – 1036.

Van der Maesen L.J.G., Rundir R.P.S., Remanandan P. The current status of chickpea germplasm work at ICRISAT / *Proc Int Workshop Chickpea Improv*, Hyderabad, India 28 Feb-2 March, 1979. – CRISAT, 1980. – P. 28 – 32.

Vas P., Simons G., Jesse T. The tomato Mi-1 gene confers resistance to both rootknot nematodes and potato aphids // *Nature Biotechnology*, 1998. – 16. – P. 1365 – 1369.

Vyas H.N., Ghari M.S., Beria N.N. Bioefficacy of quinalphos against gram pod borer, *Heliothis armigera* hubner attacking chickpea in Gujrat through aerial spraying // *Int Chickpea Newslett*, 1983. – 9. – P. 22 – 24.

Witter P., Benko-Iseppon A.M., Humel B. et al. A linkage map of the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome based on recombinant inbred lines from a *C. arietinum* x *C. reticulatum* cross: Localization of resistance genes for *Fusarium* with races 4 and 5 // *Theor and Appl. Genet*, 2000. – 101, N 7. – P. 1155 – 1163.

Wright M.S., Koehler S.M., Hinchee M.A., Carnes M.G. Plant regeneration by organogenesis in *Glycine max* // *Plant Cell Rep*, 1986. – 5. – P. 150-154.

Wright M.S., Ward D.V., Hinchee M.A. et al. Regeneration of soybean (*Glycine max* L. Merr.) from cultured primary leaf tissue // *Plant Cell Rep*, 1987. – 6. – P. 83 – 89.

Yadav J.K., Singh H.L., Kumar R. Determining selection components in chickpea (*Cicer arietinum* L.) // *Plant Arch.*, 2003. – 3, N 1. – P. 125 – 128.

Zong-Xui S., Cheng-Zhang Z., Kang-Le Z. et al. Somaclonal genetics of rice, *Oryza sativa* L. // *Theor. and Appl. Genet.*, 1983. – 87, N 1. – P. 67 – 73.

Ала А.Я. Использование генофонда дикой и культурной сои в генетико-селекционных исследованиях. / Генетические ресурсы культурных растений. Проблемы мобилизации, инвентаризации, сохранения и изучение генофонда важнейших с-х культур для решения приоритетных задач селекции: Междунар. науч. практ. конф. Санкт-Петербург, 13-16 ноября 2001: Тезисы докл. – СПб.: 2001. – С. 195 – 196.

Ала А.Я. Происхождение сои *Glycine max* (L.) Merrill / Биология, генетика и микробиология сои: Науч. тр. – Новосибирск, 1976. – С. 35 – 40.

Ала А.Я. Создание и использование генофонда дикой уссурийской сои в генетических исследованиях: Метод. рекомендации. – Новосибирск, 1984. – 49 с.

Ала В.С. Изменчивость основных признаков у гибридов F₃, полученных от скрещивания мутантов с дикой соей / Резервы повышения продуктивности сои: Сб. науч. тр. ВАСХНИЛ, Сиб. отд-ние, ВНИИ сои. – Новосибирск, 1990. – С. 22 – 26.

Алексиева А. Использование на экспериментальной мутагенезиса за создание на высокопродуктивных линиях сои // Растениеводство. Науки, 2000. – 37, №8 – С. 576 – 579.

Ананьев Е. В., Бочканов С. С., Сонина Н. В. и др. Измененная структура хлоропластного генома в регенерантах тритикале из культуры пыльников // Всесоюз. конф. по генетике сомат. клеток в культуре: Тез. докл. (Звенигород, 19-22 окт. 1986 г.). – М., 1986. – С. 89 – 90.

Анохина О.В. Формирование урожайности нута в зависимости от сроков и норм посева в остепненной зоне Кузнецкой котловины: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. – Омск, 1999. – 14 с.

Асалиев А.И., Серов В.М. Сравнительная солеустойчивость зернобобовых культур / Физиолого-биохимические особенности зернобобовых культур. – Орел, 1973. – С. 128 – 132.

Ассеева Т. В. Вегетативные мутации картофеля / Генетика, 1968. – 4, № 3. С. 145 – 164.

Атабекова А.И. Соматические мутации у бобовых / Вопросы эволюции, биогеографии, генетики и селекции. – М. – Л.: Изд-во АН СССР. – С. 43 – 51.

Атанасов А. Биотехнология в растениеводстве – Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 1993. – 242 с.

Балаилов В.В. Селекция, семеноводство и технология возделывания нута в Нижнем Поволжье. – Волгоград: Гос. с.-х. акад., 1995. – 46 с.

Барсукова Е.Н. Использование метода культуры тканей в селекции гречихи: Автореф. дис... канд. с.-х. наук / Приморский НИСХ. – Благовещенск, 2000. – 24 с.

Безуглая О.Н., Кобызова Л.Н. Перспективное направление селекции нута на Украине – создание сортов, толерантных к аскохитозу / Генетические ресурсы культурных растений: Тез. докл. междунар. науч.-практ. конф., СПб, 13-16 ноября 2001. – СПб, 2001. – С. 212 – 213.

Билай В.И. Фузариоз. – Киев: Наукова думка, 1977. – 443 с.

Боднар Г.В., Лавриненко Г.Т. Зернобобовые культуры. – М.: Колос, 1977. – 256 с.

Бодягин Я.М. Совершенствование технологии возделывания нута в условиях Хакасии: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. – Новосибирск, 2004. – 30 с.

Бреславец Л. П. Полиплоидия в природе и опыте. – М.: Изд-во АН СССР, 1963. – 364 с.

Булах П.П. Мировой генофонд сои на Дальнем Востоке России // Докл. РАСХН, 2004. – №4. – С. 4 – 8.

Булах П.П. Направление работ и источники для селекции сои / Резервы повышения продуктивности сои: Сб. науч. тр. ВАСХНИЛ, Сиб. отд-ние, ВНИИ сои. – Новосибирск, 1990. – С. 49 – 55.

Булынецов С.В. Дикие виды нута и перспективы их использования в селекции / Генетические ресурсы культурных растений. Проблемы мобилизации, инвентаризации, сохранения и изучения генофонда важнейших с.-х. культур для

решения приоритетных задач селекции: Тез. докл. междунар. науч.-практ. конф. Санкт-Петербург, 13 – 16 нояб. 2001. – СПб, 2001. – С. 222 – 223.

Булынец С.В. Мировая коллекция нута и перспективы ее использования / Матер. 5 Междунар. Симп. «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования», Пушкино, 9 с 14 июня 2003. – Т.2 – М., 2003. – С. 19 – 21.

Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.

Бутенко Р. Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений. – М.: Наука, 1975, – С. 1 – 50.

Бутенко Р. Г. Культура изолированных протопластов, клеток и тканей в решении задач физиологии растений / Новые направления в физиологии растений. – М.: Наука, 1985. – С. 16 – 32.

Бутенко Р.Г. Клеточные технологии в селекционном процессе / Состояние и перспективы развития сельскохозяйственной биотехнологии: Материалы Всесоюзной конференции, Москва, июнь 1986г. – Л.: ВИР, 1986. – С. 29 – 38.

Бутенко Р. Г., Шамина З. Б., Фролова Л. В. Индуцированный органогенез и характеристика растений, полученных в культуре тканей табака // Генетика, 1967. – 3, № 3. – С. 23-39.

Буянова В.Н. Нут в Кулундинской степи: Метод. реком. / ВАСХНИЛ. Сиб. отд-ние, Кулундинская СХОС. – Новосибирск, 1989. – 13 с.

Вавилов Н.И. Ботанико-географические основы селекции / Избранные сочинения. – М.: Колос, 1966. – С. 176 – 225.

Ванифатьев А.Г. Нут в Северном Казахстане. – Алма-Ата: Кайнар, 1981. – 56с.

Васильев С.В. Определение оптимальных параметров культивирования пыльников пшеницы в культуре *in vitro* / Генетические ресурсы и эффективные методы создания нового селекционного материала с.-х. растений. – Новосибирск, 1994. – С. 12-13.

Васильева Т.А. Расходование воды растениями разных сортов сои // НТБ ВНИИМК, 1989. – Вып. 2 (105). – С. 14 – 18.

Васякин Н.И. Перспективы возделывания и селекции сои в Западной Сибири // Бюл. ВИР. – Л., 1985. 153. – С. 66 – 68.

Васякин Н.И. Селекция зернобобовых – важный резерв пищевого и кормового белка // Вестн. РАСХН, 1995. – №3. – С.28 – 29.

Васякин Н.И. Зернобобовые культуры в Западной Сибири. – Новосибирск, 2002. – 184 с.

Васякин Н.И. Селекция зернобобовых культур в Западной Сибири / Дисс. в виде науч. докл....д-ра с.-х. наук – Новосибирск: РАСХН. Сиб. отд-ние, 2003. – 80 с.

Ващенко Т.Г., Павлюк Н.Т., Буховец А.Г. Анализ сопряженности элементов продуктивности у сои // Сел. и сем., 2004. – № 1. – С. 10 – 12.

Витанова З., Влахова М., Денчев П. и др. Соматоклональная изменчивость // Физиология и биохимия культурных растений, 1990. – 22, № 5. – С. 419 – 426.

Вишнякова М.А. Системы семенной репродукции зерновых бобовых. Теоретические и прикладные аспекты // С.-х. биология, 2004. – №5. – С. 22 – 32.

Вишнякова М.А. Эволюция систем семенного размножения в семействе бобовых (*Fabaceae*) в процессе доместикации / Ботанические исследования в азиатской России: Мат. XI съезда РБО (18-22 авг. 2003 г., Новосибирск-Барнаул). Т. 3 – Барнаул: Изд-во «АзБука», 2003. – С. 75 – 77.

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

Гайдукович Я. Б., Омелянюк Л.В. Селекционная ценность сортообразцов коллекции сои в условиях южной лесостепи Западной Сибири / Повышение эффективности селекции и семеноводства с.-х. растений: Докл. и сообщ. 8 генет.-селек. школы, Новосибирск, 11-16 нояб. 2002 г. – Новосибирск, 2002. – С. 153 – 155.

Гапоненко А. К., Маликова Н. И., Охрименко Г. Н., Созинов А. А. Получение соматоклональных линий у злаков (*Triticum aestivum* L. и *Hordeum vulgare* L.) // Докл. АН СССР, 1985. – 283, №6. – С. 1471 – 1475.

Германцева Н.И. Биологические особенности, селекция и семеноводство нута в засушливом Поволжье: Автореф. дис. ... докт. с.-х. наук. – Пенза, 2001. – 32 с.

Глазко В.И. Генетически детерминированный полиморфизм у некоторых сортов сои (*Glycine max*) и дикой сои (*Glycine soja*) // Цитол. и генет., 2000. – 34, №2. – С.77 – 83.

Глеба Д.М., Глеба Ю.Ю. Пивень Н.М., Славенас И.Ю. Цитофотометрическое изучение изменения содержания ДНК в процессе культивирования мезофильных протопластов табака и влияние обработки N-нитрозо-N-метилмочевинной на спектр плоидности клеток // Генетика, 1978. – 14, № 11. – С. 1946 – 1954.

Голованова И.В., Никитина Е.Д. Факторы, влияющие на эффективность андрогенеза *in vitro* у мягкой пшеницы / Генет. ресурсы и эффектив. методы создания нового селекц. материала с.-х. растений. – Новосибирск, 1994. – С. 20-22.

Голубовский М.Д. Неканонические наследственные изменения // Природа, 2001. №8. – С. 3-9; №9. – С. 3-8.

Гончаров П.Л. Оптимизация селекционного процесса / Повышение эффективности селекции и семеноводства сельскохозяйственных растений: Докл. и сообщ. VIII генет.-сел. школы (Новосибирск, 11-16 нояб. 2001 г.). – Новосибирск, 2002. – С. 5 – 16.

Горин В.Е. Новый сорт сои для условий Сибири / Исходный материал и результаты селекции кормовых культур: Науч.-техн. бюл. СибНИИ кормов – Вып. 1. – Новосибирск, 1984. – С. 6 – 12.

Гостимский С. А., Багрова А. М., Ежова Т. А. Обнаружение и цитогенетический анализ изменчивости, возникающей при регенерации растений из культуры ткани полевого гороха // Докл. АН СССР, 1985. – 283, № 4. – С. 1007 – 1011.

Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Сорты растений. – М., 2004.

Дарвин Ч. Изменение животных и растений в домашнем состоянии. – СПб: Тип. А.А. Пороховщикова, 1896. – 233 с.

Дега Л.А., Фисенко П.П., Грицюк И.И. Результаты испытания соматоклональных линий сои на устойчивость к наиболее вредоносным патогенам в Приморье / Пути повышения эффективности научных исследований на Дальнем Востоке: Сб. науч. тр. Прим. НИИСХ. – Новосибирск, 2003. – Т. 1: Селекция и растениеводство. – С.11 – 15

Дейнеко Е.В., Цевелева О.Н., Пельтек С.Е. и др. Соматоклональная изменчивость морфологических и биохимических признаков у растений-регенерантов люцерны // Физиология растений, 1997. – 44, № 5. – С. 775 – 781.

Дмитриева Н.Н., Бутенко Р.Г. Синтез белка при переходе к каллусообразованию в сердцевинной паренхиме стебля табака // Физиол. раст., 1970. – 17. – С. 330 – 335.

Дмитриева Н.Н., Липский А.Х. О роли ауксина и кинетина при индукции делений в сердцевинной паренхиме стебля табака // Физиол. раст., 1973. – 20. – С. 339 – 343.

Долгих Ю.И., Шалмина З.Б. Современные представления о причинах и механизмах соматклональной изменчивости / Молекулярные механизмы генетических процессов. – М.: Наука, 1991. – С. 123 – 127.

Донцова Т.В. Каллусо- и побегообразование у сортов сои, районированных в Амурской области / Пути повышения устойчивости производства сои на Дальнем Востоке. – Новосибирск, 1989. – С. 128 – 136.

Драгавцев В.А. Эколого-генетическая модель организации количественных признаков растений // С.-х. биология, 1995. – №5. – С. 20 – 30.

Дубинин Н.П. Общая генетика. – М.: Наука, 1986. – 559 с.

Дудина Т. Г., Горин В.Е. Результаты изучения коллекции сои в условиях Новосибирской области / Научные проблемы сибирского кормопроизводства: технические и селекционные достижения. Сб. науч. тр. СибНИИ кормов. – Новосибирск, – 1999. – С. 160 – 167.

Дунин М., Кузнецова А., Шатова Е. Регенерация семян сои / Соя и новые культуры: 2 года работы Института сои и спецкультур. – М., 1933. – С. 18 – 25.

Енкен В.Б. Соя. – М.: Сельхозгиз, 1959. – 622 с.

Животовский Л.А. Популяционная биометрия. – М., 1991. – 217 с.

Жук И.П. Устойчивость соматических клонов томата к вирусу табачной мозаики // Микробиол. журн., 1993. – 55, № 6. – С. 41 – 46.

Жуковский П.М. Культурные растения и их сородичи. – Л.: Колос, 1971. – 752 с.

Жученко А.А. Адаптивная система селекции растений (эколого-генетические основы), – Т. 1. – М.: Изд-во Российского ун-та дружбы народов, 2001. – 780 с.

Жученко А.А. Роль генетической инженерии в адаптивной системе селекции растений (мифы и реалии) // С.-х. биология, 2003. – №1. – С. 3 – 33.

Зайцев Г.Н. Методика биометрических расчетов. – М., 1973. – 256 с.

Зайцев Г.Н. Математика в экспериментальной ботанике. – М.: Наука, 1990. – 295 с.

Зобова Н.В. Использование спектров гордеинов в отборе генотипов ячменя с определенными качественными признаками / Повышение эффективности селекции и семеноводства сельскохозяйственных растений: Докл. и сообщ. VIII генетико-селекционной школы (11-16 нояб. 2001 г.). – Новосибирск, 2002. – С. 201 – 204.

Зобова Н.В., Луговцова С.Ю., Коньшева Е.Н. Выявление полиморфизма генотипов ярового ячменя по устойчивости к эдафическим факторам с использованием биотехнологических методов / Повышение эффективности селекции и семеноводства сельскохозяйственных растений: Докл. и сообщ. VIII генетико-селекционной школы (11-16 нояб. 2001 г.). – РАСХН Сиб. отд-ние: СибНИИРС-НГАУ. – Новосибирск, 2002. – С. 204-207.

Зубкова Н.Ф., Букашкина З.В., Кулаева О.Н. Исследование дефолирующего действия цитокининов // Физиология растений, 1990. – 37, вып. 3. – С. 535 – 541.

Иванов Н.Р. Исходный материал для селекции зерновых бобовых культур / Селекция и семеноводство зерновых и кормовых культур. – М.: Колос, 1972. – С. 251 – 257.

Ильенко И.И., Яворская Т.К., Бех Н.С., Горбатьюк Я.В. Морфологическая и биохимическая характеристика соматоклональных вариантов сахарной свеклы / Биотехнологические методы в селекции сахарной свеклы. – М.: Агропромиздат, 1989. – С. 48-54.

Казьмин Г.Т., Комолых О.М. Химический и радиационный мутагенез в селекции сои на Дальнем Востоке // Вестн. РАСХН, 2000. – №3. – С. 27 – 29.

Каталог сортов сельскохозяйственных культур, созданных учеными Сибири и включенных в госреестр РФ (районированных) в 1929 – 2003 гг. / РАСХН. Сиб. отд-ние. – Вып.3. – Новосибирск, 2003. – 272 с.

Кашеваров Н.И., Солошенко В.А., Васякин Н.И., Лях А.А. Соя в Западной Сибири – Новосибирск: Юпитер, 2004. – 256 с.

Кирилленко С.К., Похвалитый А.П. Новые мутанты сои // Сел. и семен., 1994. – №1. – С. 41 – 43.

Кирилленко С.К., Похвалитый А.П., Усков С.А. Ценные мутанты формы сои “Подзимняя кормовая” // Сел. и семен., 1994. – №2. – С. 36 – 38.

Ковалёв В.М. Совершенствование способов регуляции физиолого-биохимических процессов и метаболизма живых организмов // С.-х. биология, 2001. – №1. – С. 13 – 18.

Кожеевников А.Р., Михайленко М.А., Попова Г.И. Полевые культуры Западной Сибири. – Омск: Книжное изд-во, 1958. – 480 с.

Константинов Ю.М., Ривкин М.И. Возможный свободнорадикальный механизм возникновения соматоклональной изменчивости у растений / Молекулярные механизмы генетических процессов. – М.: Наука, 1991. – С. 127 – 130.

Коньшева Е.Н. Использование биотехнологических методов в повышении соле- и кислотоустойчивости ярового ячменя: Автореф. дис... канд. биол. наук / КГАУ, КНИИСХ. – Красноярск, 2004. – 20 с.

Корнилов А.А., Асалиев А.И., Сыроев Ю.А. Сравнительная засухоустойчивость и солевыносливость сортов гороха, нута и чины / Устойчивость зерновых и крупяных культур к неблагоприятным факторам среды и пути ее повышения. – Орел: Изд. ВНИИЗБК, 1982. – С. 27 – 34.

Корсаков Н.И. Исходный материал для селекции сои на повышенное содержание белка в семенах / Физиолого-биохимические особенности зернобобовых культур. – Орел, 1973. – С. 227 – 234.

Корсаков Н.И. Соя (Систематика и основы селекции): Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Л., 1973. – 44 с.

Корсаков Н.И. Географические очаги формообразования и гомологические ряды в наследственной изменчивости признаков рода *Glycine* L. / Тр. по прикл. бот., ген. и сел. – Л.: ВИР, 1982. – 72, вып. 1. – С. 3 – 15.

Корсаков Н.И., Булах П.П. Изменчивость и наследственная обусловленность признаков сои / Тр. по прикл. бот., ген. и сел. – Л.: ВИР, 1978. – 63, вып. 1. – С. 81 – 101.

Корсаков Н.И., Ващенко А.П., Фисенко П.П., Мудрик Н.В. Перспективы селекции сои в Приморье / Тр. по прикл. бот., ген. и сел. – Л.: ВИР, 1978. – 63, вып. 1. – С. 102 – 107.

Красковская Н.А. Изменчивость количественных признаков у сои при разных методах создания исходного материала / Пути повышения эффективности научных исследований на Дальнем Востоке: Сб. науч. тр. Т. 1. – Новосибирск, 2003. – С. 80 – 86.

Кренке Н.П. Регенерация растений. – М., Л.: Изд-во АН СССР, 1950. – 675 с.

Кривов Н.В., Голубовский М.Д., Лысинов В.Н. Нестабильность макромутации «корнграсс» у кукурузы: модель и эксперимент // Генетика, 1993. – 29, №1. – С. 99 – 113.

Кузин В.Ф., Рязанцева Т.П. Итоги и задачи селекционной работы с соей / Селекция и семеноводство зерновых и кормовых культур. – М.: Колос, 1972. – С. 285 – 290.

Кузнецова Н.Ф. Процессы активации в ходе репродуктивного развития женской генеративной сферы *Pinus sylvestris* L. // Цитология, 1998. – 40, № 10. – С. 849 – 854.

Кузнецова Н.Ф. Образование инициали спорофита *Pinus sylvestris* L., исходя из расшифровки репродуктивного цикла сосны / Ботанические исследования в азиатской России: Мат. XI съезда РБО (18-22 авг. 2003 г., Новосибирск-Барнаул). Т. 2. – Барнаул: Изд-во «АзБука», 2003. – С. 149 – 150.

Куминова А.В., Вагина Т.В., Лапшина Е.И. Геоботаническое районирование юго-востока Западно-Сибирской низменности / Растительность степной и лесостепной зон Западной Сибири. – Новосибирск: Изд-во СО АН СССР, 1963. – С. 35 – 62.

Кунах В. А. Изменчивость числа хромосом в онтогенезе высших растений // Цитология и генетика, 1978. – 12, № 2. – С. 160 – 173.

Кунах В. А. Геномная изменчивость соматических клеток растений и факторы, регулирующие этот процесс // Цитология и генетика, 1980. – 14, № 1. – С. 73 – 81.

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.

Кучеренко Л.А. Подходы к разработке технологии массовой регенерации растений *in vitro* / Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. – М.: Наука, 1991. – С. 232 – 242.

Лавриненко Г.Т., Бабич А.А., Кузин В.Ф., Губанов П.Е. Соя. – М.: Россельхозиздат, 1978. – 189 с.

Лещенко А.К. Культура сои на Украине. – Киев, 1962. – 325 с.

Лещенко А.К. Экспериментальное получение мутаций у сои / Масличные культуры. – Краснодар: ВНИИМК, 1945.

Лещенко А.К., Михайлов В.Г., Сичкарь В.И. и др. Генетика сои / Генетика культурных растений: Зернобобовые, овощные, бахчевые. – Л.: Агропромиздат, Ленингр. отд-ние, 1990. – С. 111 – 134.

Лещенко А.К., Сичкарь В.И., Михайлов В.Г., Марьюшкин В.Ф. Соя (генетика, селекция, семеноводство). – Киев: Наук. думка, 1987. – 256 с.

Ливанов К.В. Нут на Юго-Востоке. – Саратов: Книжное изд-во, 1963. – 48 с.

Люзнер Л.Д. Регенерация и развитие. – М.: Наука, 1982. – 167 с.

Лукин Н.Д. Селекция сои на скороспелость // Науч.-техн. бюл. ВНИИМК, 1988. – 4 (103). – С. 3 – 5.

Лутова Л.А. Генетический контроль признаков тотипотентности и их роль в онтогенетической адаптации высших растений: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – СПб., 1993. – 38 с.

Манакова Т.А. Селекционная ценность исходного материала сои для условий центральной лесостепи Кемеровской области: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. – Омск, 2001. – 15 с.

Марьюшкин В.Ф. Даценко В.К. Влияние генотипа сорта на способность к котилегонии у сои / Генетика, селекция и технология возделывания сои на Украине и в Молдове. – Одесса: ВСГИ, 1991. – С. 43 – 47.

Методические указания по изучению коллекции зерновых бобовых культур. – Л.: ВИР, 1975. – С. 3 – 39.

Методические указания по селекции и семеноводству сои. – М., 1981. – 34с.

Мирошниченко И.И. Нут / Руководство по апробации сельскохозяйственных культур (зерновые, крупяные и зернобобовые культуры). – М.: Колос, 1976. – С. 314 – 318.

Мирошниченко И.И., Паалова А.М. Нут. – М.-Л.: Сельхозгиз, 1953. – 111 с.

Моисеева Н.А. Молекулярные и клеточные механизмы морфогенеза в культуре клеток растений / Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. – М.: Наука, 1991. – С. 166 – 185.

Мудрик Н.В., Дега Л.А., Фисенко П.П. Результаты изучения сортов сои, полученных методом тканевой культуры // Селекция и семеноводство с.-х. культур – основа подъема сельского хозяйства Дальневосточного региона. Сб. науч. тр. Приморского НИИСХ. – Новосибирск, 2000. – с.38 – 43.

Мякушко Ю.П. Селекция сои на повышенную белковость / Физиолого-биохимические особенности зернобобовых культур. – Орел: ВНИИЗБК, 1973. – С. 281 – 289.

Никитина Е.Д. Морфобиологические особенности соматоклональных линий *Triticum aestivum* L. / АПК Сибири, Монголии и Республики Казахстан в XXI веке: Материалы 4-й Междунар. науч.-практ. конф. (Улан-Батор, 9-10 июля 2001 г.) Новосибирск, 2001. – С. 172 – 173.

Павлова А.М., Генералов Г.Ф. Нут / Руководство по апробации сельскохозяйственных культур. – М.: Сельхозгиз, 1949. – С. 318 – 327.

Першина Л.А., Нумерова О.М., Белова Л.И. и др. Особенности андрогенеза у мягкой пшеницы, межвидовых и межродовых гибридов // Сиб. биол. журн., 1993. – Вып. 3. – С. 3 – 8.

Першина Л.А., Шумный В.К. Особенности каллусной ткани и растений-регенерантов ячменно-ржаных и ячменно-пшеничных гибридов / Культура клеток растений и биотехнология. – М.: Наука, 1986. – С. 176 – 178.

Пирузян Э.С. Основы генетической инженерии растений. – М.: Наука, 1988. – 304 с.

Пробатова Н.С., Рудыко Э.Г. Хромосомные числа некоторых видов сосудистых растений Дальнего Востока // Изв. СО АН СССР, сер. биол., 1981. – 2, № 10. – С. 77 – 82.

Простакова Ж.Г., Бронштейн А.И. Взаимосвязь признаков устойчивости сои к критическим факторам среды на стадии всходов / Методы отбора по комплексам признаков в селекции растений: Тез. докл. Всесоюз. совещ. – Ялта, 1989. – С. 91.

Рейви П., Эверт Р., Айхорн С. Современная ботаника. – Т. 1, М.: Мир, 1990. – 348 с. (Raven P.H., Evert R.F., Eichhorn S.E. Biology of plants. 4-th edition. – Worth publishers, 1986).

Родина Н.А. Достижения генетики, селекции и биотехнологии в растениеводстве / Материалы Годич. общ. собр., посвящ. 20-летнему юбилею со дня основания Отд-ния по Нечернозем-зоне РФ Россельхозакадемии. – СПб.- Пушкин, 1995. – С. 114 – 130.

Рожанская О.А. Особенности соматклональной изменчивости количественных признаков сои / Повышение эффективности селекции и семеноводства сельскохозяйственных растений: Докл.и сообщ. VIII генет.-сел. школы (Новосибирск, 11-16 нояб. 2001 г.). – Новосибирск, 2002а. – С. 89 – 95.

Рожанская О.А. Особенности морфогенеза *in vitro* в изолированных тканях нута // Сиб. вестн. с.-х. науки, 2002b. – №1-2. – С. 47 – 51.

Рожанская О.А. Сравнительный анализ количественной изменчивости в популяциях соматклонов и мутантов люцерны // Сиб. вестн. с.-х. науки, 2005. – №1. – С. 31 – 37.

Рожанская О.А., Азаркова З.В., Коробова Л.Н. Количественные вариации признаков соматклонов нута (*Cicer arietinum* L.) // Сиб. вест. с.-х. науки, 2002. – № 3-4. – С. 40 – 46.

Рожанская О.А., Клеблеева Н.Г. Изменчивость хозяйственных признаков рапса, полученного *in vitro* // Науч.-техн. бюл. РАСХН, Сиб. отд-ние, СибНИИ кормов.– Новосибирск, 1994а. – С. 33 – 44.

Рожанская О.А., Клеблеева Н.Г. Культура тканей сои и морфогенез/ Корма и их производство в Сибири: Сб. науч. тр. РАСХН, Сиб. отд-ние, СибНИИ кормов.– Новосибирск, 1994б. – С.117 – 126.

Рожанская О.А., Клеблеева Н.Г. Соматический эмбриогенез и соматклональная изменчивость эспарцета песчаного / Сб. науч. тр. РАСХН, Сиб. отд-ние. СибНИИ кормов. – Новосибирск, 1999. – С. 141 – 148.

Рожанская О.А., Клеблеева Н.Г., Кравченко А.Ю. Соматклональные вариации количественных признаков ярового рапса // Докл. РАСХН, 1999. – № 3.– С. 17 – 18.

Рожанская О.А., Козиенко Г.Н. Опыт культивирования *in vitro* ярового рапса // Сиб. вест. с.-х. науки, 1989. – № 3. – С. 42 – 45.

Рожанская О.А., Рожанская Н.А., Филиппова Н.Д., Хоменко А.М. Использование гелий-неонового лазера для создания нового селекционного материала сои / Информационные технологии, информационные измерительные системы и приборы в исследованиях сельскохозяйственных процессов. Ч. 1. Материалы Междунар. науч.-практ. конф. «АГРОИНФО-2003» (Новосибирск, 22-23 окт. 2003 г.). РАСХН. Сиб. отд-ние. – Новосибирск, 2003. – С. 133 – 137.

Рожанская О.А., Свежинцева Е.А. Получение и отбор соматклональных вариаций для селекции рапса / Метод. рекомендации/ СО РАСХН. СибНИИ кормов. – Новосибирск, 1991. – 28 с.

Росс Х. Селекция картофеля. Проблемы и перспективы. – М.: Агропромиздат, 1989. – 183 с. (Ross H. Potato breeding – problems and perspectives. – Berlin & Hamburg: Verlag Paul Parey, 1986.)

Росеев В.М. Реакции клеточных систем зерновых культур *in vitro* и биотестирование селекционного материала на устойчивость к неблагоприятным абиотическим факторам среды: Автореф. дис... канд. с.-х. наук / СибНИИСХ. – Омск, 2001. – 16 с.

Савченко Е.В., Кунах В.А. Сравнительная характеристика культуры тканей двух родственных линий кукурузы, различающихся по количеству

гетерохроматина / Культура клеток растений и биотехнология. – М.: Наука, 1986. – С. 214 – 218.

Садохин И.Ю. Адаптация технологии возделывания нута к степным условиям Западной Сибири: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. – Новосибирск, 2002. – 15 с.

Сатарова Т.Н. Индукция и особенности дифференциации новообразований в культуре пыльников различных генотипов кукурузы // С.-х. биология. Сер. Биология растений, 1993. – № 1. – С. 71 – 76.

Сеитова А.М., Изнатов А.М., Супрунова Т.П., Цветков И.Л., Дейнеко Е.Л., Дорохов Д.Б., Шумный В.К., Скрябин К.Г. Оценка генетического разнообразия дикорастущей сои (*Glycine soja* Siebold et Zucc.) в дальневосточном регионе России // Генетика, 2004. – 40, № 2. – С. 224 – 231.

Сеферова И. В. Распространение дикорастущей уссурийской сои (*Glycine soja*) на территории России и представленность её в коллекции ВИР / Генетические ресурсы культурных растений: Междунар. науч.-практ. конф. (СПб, 13-16 нояб. 2001 г.) Тезисы докл. – СПб, 2001. – С. 30 – 52.

Сеферова И.В. Анализ географического распространения разновидностей культурного нута *Cicer arietinum* L. // Науч.-техн.бюл. ВИР, 1994. – № 233. – С. 95 – 99.

Сеферова И.В. Происхождение и эволюция рода Нут – *Cicer* L. // Сб. науч. тр. по прикл. ботанике, генетике и селекции ВИР, 2001. – 154. – С. 92-100.

Сиволап Ю.М., Брик А.Ф., Сичкарь В.И. Исследование молекулярно-генетического полиморфизма сои (*Glycine max* (L.) Merr.) с помощью ПЦР-анализа // Цитол. и генет., 1998. – 32, №4. – С. 89 – 96.

Сидоров В. А., Белицер Н. В., Артеменко В. С. и др. Ультраструктурное и цитохимическое исследование протопластов табака на стадиях первичных клеточных колоний // Цитология и генетика, 1977. – 11, № 3. – С. 291 – 297.

Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. – Киев: Наук. думка, 1990. – 280 с.

Синская Е.Н. Историческая география культурной флоры. – Л.: Колос, 1969. – 479 с.

Сичкар В.Г., Бушулян О.В. Перспективи селекції нуту в умовах південного степу України // Вісн. аграр. науки, 2000. – № 1. – С. 38 – 40

Скворцов В.Б. Дикая и культурная соя Восточной Азии // Вестник Манчжурии. – Харбин, 1927. – №9. – С. 35 – 43.

Смирнова-Иконникова М.И. Содержание белка у зерновых бобовых культур // Вестник с.-х. науки, 1962. – №7. – С. 45 – 52.

Соловьев В.П. Морфогенез в культуре изолированных органов / Резервы повышения продуктивности сои: Сб тр. ВНИИ сои. – Новосибирск, 1990. – С. 31 – 35.

Соловьев В.П., Родина Е.А. Изучение влияния фитогормонов на пролиферацию каллуса и морфогенез в культуре изолированных органов сои / Науч.-техн. бюл. ВНИИ сои, 1990. – №2. – С. 8 – 16.

Солодкая Л.А., Новоселова Е.Ю. Генетические особенности клеток клевера лугового в культуре и их использование в селекции / Генетические методы в селекции кормовых трав. – Вильнюс, 1987. – С. 66 – 67.

Сорокатая Е.И. Использование биотехнологических методов для получения устойчивых к корневым гнилям форм ярового ячменя: Автореф. дис... канд. биол. наук / КГАУ. – Красноярск, 2001. – 18 с.

Сосудистые растения советского Дальнего Востока. – 1985 – 1996.

Степанова В.М. Агроклиматическая оценка условий возделывания сои в СССР / Агроклиматические ресурсы природных зон СССР и их использование. – Л.: Гидрометеиздат, 1970. – С. 39 – 47.

Степанова В.М. Климат и сорт (соя). – Л.: Гидрометеиздат, 1985. – 183 с.

Толоконников В.В. О селекции высокоурожайных сортов сои для зон поливного земледелия и Нижнего Поволжья. // С.-х. биол., сер. биол. раст., 1999. – №5 – С. 75 – 81.

Торопова Е.Ю., Стецов Г.Я., Чулкина В.А. Эпифитотимологические основы систем защиты растений. – Новосибирск, 2002. – 578 с.

Трембак Е.Н. Естественная гибридизация сои как метод создания исходного материала для селекции: Автореф. дис ... канд. биол. наук. – Краснодар: ВНИИ риса, 2001. – 24 с.

Туркова Е.В., Ахундова В.А. Об особенностях генеративного развития нута // Селекция и семеноводство, 1995. – № 2. – С.17 – 20.

Туркова Е.В., Ахундова В.А. Хозяйственно ценные образцы нута // Селекция и семеноводство, 1991. – № 5. – С.25 – 27.

Туркова Н.С. Химические средства управления ростом растений / Физиология сельскохозяйственных растений. Т. 2. – М.: Изд-во Московского ун-та, 1967. – С. 289 – 322.

Филатов А.Н. Селекция и семеноводство нута в Поволжье: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. – Саратов, 1998. – 21 с.

Фисенко П.П., Барсукова Е.Н., Уманец А.В. и др. Сельскохозяйственная биотехнология: итоги и перспективы использования в Приморском НИИСХ / Пути повышения эффективности научных исследований на Дальнем Востоке: Сб. науч. тр. Прим. НИИСХ.: – Т. 1: Селекция и растениеводство. – Новосибирск, 2003. – С. 3 – 10

Фисенко П.П., Галукия Г.Д. Регенерация растений сои из культуры семядольного узла / Некоторые вопросы селекции и технологии возделывания сельскохозяйственных культур в Приморье: Сб. науч. тр. ПримНИИСХ. – Новосибирск, 1994. – С. 11 – 22.

Фисенко П.П., Галукия Г.Д. Соматический эмбриогенез и регенерация растений сои из эмбрионного каллуса / Вопросы селекции и технологии возделывания полевых культур в Приморье: Сб. науч. тр. ПримНИИСХ. – Новосибирск, 1992. – С. 20 – 28.

Фисенко П.П., Мудрик Н.В. Использование нетрадиционных методов в селекции сои Приморья / Селекция и семеноводство с.-х. культур – основа подъема сельского хозяйства Дальневосточного региона: Сб. науч. тр. Приморского НИИСХ. – Новосибирск, 2000. – С. 36 – 38.

Фоменко Н.Д. Изучение эффективности методов отбора в поздних поколениях гетерогенных популяций сои. / Селекция и семеноводство с.-х. культур – основа подъема сельского хозяйства Дальневосточного региона: Сб. науч. тр. Приморского НИИСХ. – Новосибирск, 2000. – С. 115 – 118.

Фролова Л. В., Шамина З. В. Цитогенетическая характеристика культуры тканей растений из семейства бобовых // Цитология и генетика, 1974. – 8, № 5. – С. 413 – 418.

Хвырлева Ц. Д., Рыжик. М. В., Ананьев Е. В. и др. Деметилирование рДНК в каллусной ткани ячменя, культивируемой *in vitro* // Докл. АН СССР, 1986. – 290, № 5. – С. 1249 – 1252.

Хохлова Н.И., Фисенко П.П. Культура незрелых зародышей диких австралийских видов сои / Некоторые вопросы селекции и технологии возделывания сельскохозяйственных культур в Приморье: Сб. науч. тр. ПримНИИСХ. – Новосибирск, 1994. – С. 10 – 17

Храмова Л.М. Перспективы использования клеточно-инженерных работ для создания исходных форм и сортов картофеля / Использование клеточных технологий в селекции картофеля: Научные труды НИИКХ. – М., 1987. – С. 113 – 124.

Цильке Р.А. Некоторые аспекты генной инженерии у растений / Повышение эффективности селекции и семеноводства сельскохозяйственных растений: Докл. и сообщ. VIII генет.-сел. школы (Новосибирск, 11-16 нояб. 2001 г.). – Новосибирск, 2002. – С. 17 – 23.

Шевелуха В.С. Первые результаты, проблемы и перспективы новой биотехнологии в селекции и растениеводстве / Состояние и перспективы развития с.-х. биотехнологии: Матер. Всесоюз. конф. (Москва, июнь 1986 г.) – Л.: ВИР, 1986. – С. 23 – 28.

Шевелуха В.С. Рост растений и его регуляция в онтогенезе. – М.: Колос, 1992. – 594 с.

Шумный В.К. Генная и хромосомная инженерия для растений // Вестник РАН, 2001. – 71, № 8. – С. 725 – 732.

Яговенко Т.В. Расширение спектра исходного материала для селекции люпина с использованием методов культуры тканей: Автореф. дис... канд. биол. наук / ВНИИ люпина. – М., 1998. – 18 с.

Яровой А.В. Формирование урожая зерна в посевах ярового ячменя и нута при различных технологических приемах возделывания в степной зоне Кузнецкой котловины: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. – Новосибирск, 2004. – 16 с.

СОДЕРЖАНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ	3
	ОПРЕДЕЛЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	5
Глава 1	МОРФОГЕНЕЗ IN VITRO И СОМАКЛОНАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ	6
	Применение биотехнологии в растениеводстве и селекции.....	6
	Морфогенез в культуре растительных тканей.....	8
	Роль фитогормонов в регуляции морфогенеза.....	13
	Генетическая изменчивость in vitro.....	15
	Механизмы соматклональной изменчивости	19
	Причины соматклональной изменчивости.....	21
Глава 2	СОЯ	28
	Хозяйственное значение и распространение.....	28
	Систематика и морфология.....	29
	Экология и онтогенез.....	32
	Биохимические признаки.....	35
	Генетика сои.....	38
	Направления и методы селекции.....	40
	Развитие исследований по культуре тканей сои in vitro.....	42
	Материал и методика исследований.....	43
	Морфогенез сои in vitro.....	46
	Полевые испытания	59
	Количественная изменчивость соматклонов сои.....	60
	Эффекты предпосевного облучения семян сои лазером.....	69
	Изменчивость соматклонов и мутантов сои при отборе на продуктивность.....	71
	Нестабильность соматклонов.....	81
Глава 3	НУТ	88
	Хозяйственное значение и распространение.....	88
	Происхождение нута.....	90
	Систематика и морфология.....	91
	Онтогенез и экологические особенности.....	94
	Биохимические признаки.....	97
	Болезни и вредители.....	98
	Направления и методы селекции.....	99
	Развитие методов культуры тканей нута.....	100
	Характеристика исходных сортов	103
	Морфогенез нута in vitro.....	103
	Количественная изменчивость соматклонов нута в полевых испытаниях	112
	Изменчивость корреляций признаков нута.....	115
	Устойчивость соматклонов к грибной инфекции.....	117
	Соматклоны нута с повышенной семенной продуктивностью... ..	122
	Соматклональная изменчивость в культуре семядольных узлов нута.....	125
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	130
	ЛИТЕРАТУРА	133

О.А. РОЖАНСКАЯ

**СОЯ И НУТ В СИБИРИ:
КУЛЬТУРА ТКАНЕЙ, СОМАКЛОНЫ,
МУТАНТЫ**

Книга издана в авторской редакции
Компьютерная верстка *А.С. Самахов*
Обложка *С.В. Рожанская*

Подписано в печать 22.12.2005 г. Формат 60 x 90 1/16
Объем 9,4 п.л. Заказ № 454. Тираж 300 экз.

Отпечатано в ИПЦ «Юпитер»
630501, НСО, п. Краснообск



**Рожанская
Ольга Александровна -**

заведующая лабораторией генетики и биотехнологии Сибирского НИИ кормов СО РАСХН, кандидат биологических наук. Окончила Томский государственный университет по специальности «биология», очную аспирантуру при Московском государственном университете, где в 1985 г. защитила диссертацию под руководством Т.А. Работнова. С 1986 г. работает в области биотехнологии растений, разрабатывая методические вопросы применения культуры тканей *in vitro* в селекции рапса, эспарцета, люцерны, сои и нута. О.А. Рожанская - автор более 60 научных публикаций по ботанике, биотехнологии, селекции растений.

