

1	2	3	4	5	6	7	8
24	F ₂ G. max ДЯ-1 x G. soja КЗБ-103	2	2	34	34	0	5,7 : 1
	Всего по комбинации	13	7	249	211	38	5,5 : 1
25	F ₂ G. max(М-28 x КБл- 550) x G. soja КЗ-6328	2	1	33	31	2	15 : 1
26	F ₂ G. max(Л-69 x МК-1) x G. soja КЗ-6328	2	0	27	14	13	1 : 1
	Итого при межвидовой гибридизации G. max G. soja	85	33	1841	1498	343	4,4 : 1

ЛИТЕРАТУРА .

1. Ала А.Я. Закономерности наследования признаков у межвидовых гибридов сои // Докл. ВАСХНИЛ, 1989, № 9, с. 10...12.

2. Ала А.Я., Ала В.С. Использование зародышевой плазмы диких форм в селекции // Благовещенск, 2002. 44 с.

УДК 633.853.52:631.527:581.143.6 (571.63)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА КУЛЬТУРЫ
ТКАНИ В СЕЛЕКЦИИ СОИ ПРИМОРЬЯ

П.П. Фисенко, ПримНИИСХ

Возможность возникновения соматоклональных вариаций в тканевых культурах растений широко известна. Ряд исследователей, среди которых Orton T.S. (1), Rice T.B. (2), Витанова З., Влахова Т., Денчев П., Маринова Е., Витанов В., Атанасов А. (3), Долгих Ю., Шамина З. (4), Константинов Ю.М., Ривкин М.И. (5) предполагают различные причины происхождения данного явления,

Barwale U.B., Widdholm Y.M. (6), Graybosh P.A., Edge M.E., Delannay X. (7), Freytag H., Rao - Arelli A.P. e.a. (8) опубликованы результаты работ по изучению соматоклональных вариантов сои, свидетельствующие об изменениях количественных и качественных признаков среди регенерантных линий. Заключение перечисленных ис-

следований подтверждают возможность применения технологий культуры тканей для получения новых растений сои, которые могут быть использованы в селекционных программах. Однако, спектр возможных вариаций далеко не изучен.

В данной работе представлены результаты использования метода культуры ткани в селекции сои и в первую очередь - создания и испытания соматклональных линий в условиях Приморья.

Материал и методика исследований

В процессе исследований *in vitro* использовали в качестве первичных эксплантов ткани семядолей недозрелых зародышей и семядольные узлы районированных в Приморье сортов Приморская 529, Ходсон, Приморская 13, Венера, Мечта (Приморская 301), Фортуна (Приморская 69) и регенерантная линия (Приморская 1281). Стерилизацию материала, приготовление питательных сред осуществляли согласно рекомендаций Бутенко Р.Г. (9), Калинина Ф.И., Сарнацкой В.В., Полищук В.Е. (10). Нарработку адвентивных побегов проводили по методике Write M.S., Williams M.H. e.a. (11). В основе всех питательных сред использованы минеральные ингредиенты по прописи Murashige T., Scoog F. (12) MS, витамины - Nitsch, набор цитокининов (в мг/л: зеатин - 0,033, кинетин - 0,033, БАП - 0,005 - 3,8) и ауксинов (мг/л: ИМК - 0,5 - 3,0, ИУК - 0,5 - 3,0, НУК - 0,05 - 10,0, 2,4 Д 5,0 - 10,0).

Культивировали на свету при освещенности 4-5 тыс. лк, в условиях 16/8 часового фотопериода и температуры $23 \pm 3^\circ\text{C}$. Укоренение осуществляли на безгормональных средах с половинным составом минеральной основы MS (1/2 MS) или Гамборга (1/2 B5) (13). Растения-регенераты Ro переводили в почву (горшечная культура), их дальнейшее развитие проходило в культуральной комнате. Последующие поколения соматклонов выращивали в полевых условиях согласно общепринятой в Приморье агротехники и методики постановки селекционных экспериментов в Приморском НИИСХепень поражении (%) грибными патогенами изучали при искусственном заражении листовой поверхности на жестком инфекционном фоне, содержание в семенах белка определяли по Къельдалю, жира - Сокслету.

Регенерантные линии и исходные сорта сои оценивали с помощью основных статистических характеристик количественной изменчивости по Доспехову Б.А.(Н).

Экспериментальные данные по параметрам оценки экологической пластичности сортов обрабатывались согласно методики Eberhart S.A., Russel W.A. в изложении Пакудина В.З., Лопатиной Л.М. (15).

Результаты исследований

Исследования по использованию метода культуры ткани для селекции сои в Приморском НИИСХ начаты в 1989 году. На первом этапе они были посвящены поиску способов регенерации сои *in vitro* в зависимости от поставленных целей.

Сделаны попытки применения эмбриокультуры для доразвивания зародышей, полученных от межвидовых скрещиваний культуры сои с дикими австралийскими видами, которые на ранних этапах в стадии зиготы отторгались материнским растением. В этом направлении отработана методика вычленения незрелых зародышей как культурной, так и диких видов сои, исключая их травмирование, определен минимальный размер незрелого зародыша способного дозревать в условиях *in vitro*. Проведены скрещивания культурных и диких форм с использованием биологически активных веществ. Начаты исследования по получению клеточных линий сои, устойчивых к кислым почвам, освоена методика приготовления селективных сред, имитирующих минеральные условия кислых почв, определены варианты селективных сред с различным содержанием селективного фактора, на которых индуцировали рост каллуса, проведен отбор устойчивых клеточных линий.

Более глубокие проработки проведены нами по регенерации растений из ткани семядолей незрелых зародышей (эмбриогенез) и семядольного узла (органогенез).

Высокая способность к образованию растений-регенератов при культивировании *in vitro* тканей и клеток растений является необходимым условием эффективного применения многих клеточных технологий. Новообразование растений в культивируемых каллусных культурах в значительной степени, как отмечают многие ученые, определяется физиологическим статусом экспланта. Наиболее продуктивной в плане инициации соматических зародышей определена

ткань семядолей недозрелых зародышей, размер которых, как выяснилось в результате наших экспериментов, варьирует от 4 до 6 мм.

Первостепенная роль в процессе образования эмбриоидогенного каллуса, соматических зародышей, их пролиферации отводится ауксинам и цитокинам. Среди сред, индуцирующих эмбриоидогенез, в наших исследованиях выделены питательные среды (MS), в состав которых введены ауксины: НУК - 10 мг/л или 2,4-Д - 5-10 мг/л. При этом отмечено, что прямой эмбриогенез активной проходит в первом случае, не прямой - во втором. Проллиферация эмбриоидов наиболее успешно осуществляется на среде совместного действия ауксина (НУК - 0,05 мг/л) и цитокинов (БАП - 0,033 мг/л, кинетин - 0,033 мг/л, зеатин 0,033 мг/л) или ауксина (ИУК - 1 мг/л) с сульфатом аденина - 2,0 мг/л.

Регенерационная способность первичных эксплантов кроме их величины зависит и от генотипа растения-донора. Среди сортов, нами изучаемыми, наиболее отзывчивыми к регенерации в целом оказались Ходсон, Мечта, Венера.

В процессе культивирования растений сои *in vitro* через органо-генез отмечено слабое влияние БАП при снижении его концентрации в средах. Это проявляется в уменьшении числа адвентивных побегов. Оптимальное содержание БАП колеблется от 1,0 мг/л до 1,2 мг/л. Наиболее продуктивными в плане активизации пазушных меристем и мультипликации побегов определены экспланты сорта Ходсон.

В результате многолетних исследований по изучению возможности использования культуры ткани в селекции сои мы получили растения -регенераты, которые в R₀ характеризовались различными морфологическими изменениями: карлики, химерический кожистый лист, гофрированная листовая поверхность, утолщенный стебель, полностью или частично стерильные растения, формы с завершенным и незавершенным ростом и др. Однако, они в последующих поколениях не наследовались. И, тем не менее, при выращивании регенерантов в полевых условиях нам удалось выявить варьирование ряда количественных признаков. Число линий превосходящих максимальное значение сорта-донора по признакам высота прикрепления нижнего боба, число бобов и семян на растении, масса семян с 1 растения варьировало от 14,3 до 25,7% в зависимости от генотипа исходной формы. Единичные соматональные линии превышают исходную по крупности семян и числу семян в бобе, поскольку в генетическом отношении данные признаки наиболее стабильны.

Некоторые положительные изменения среди регенерантных соматоклональных линий отмечены по содержанию белка (8,5% линий) и жира в семенах (2,8 % линий), устойчивости к пероноспорозу (11,4%), септориозу и церкоспорозу (по 2,8% линий). Выше представленные данные являются результатом трехлетних испытаний соматоклонов в контрольном питомнике.

В конкурсном сортоиспытании Приморского НИИСХ изучены пять сортов, созданных с использованием метода культуры ткани, из них четыре - Приморская 1280, Приморская 1281, Приморская 1282, Приморская 1283 эмбрио-догенного и один сорт Приморская 1284 органогенного происхождения.

По результатам испытания наиболее высокая урожайность (среднее значение трех лет) отмечена у сорта Приморская 1281 - 21,2 ц/га (см. табл.1), который на 2,7 ц/га превысил стандарт Приморская 529 (сравниваемые сорта близки по продолжительности периода вегетации).

Таблица 1
Урожайность конкурсного сортоиспытания сортов-регенератов в 1996-1998 годах, ц/га

№ п/п	Сорт	Годы			Среднее за 3 года
		1996	1997	1998	
1	Приморская 1280	22,7	18,8	15,3	18,9
2	Приморская 1281	24,5	21,3	17,7	21,2
3	Приморская 1282	22,9	20,8	15,6	19,8
4	Приморская 1283	22,3	18,8	14,4	18,5
5	Приморская 1284	22,1	20,8	16,5	19,8
6	Приморская 529 (ст.)	20,6	18,5	16,4	18,5
7	Ходсон (ст.)	17,6	17,9	15,8	17,1
НСР _{0,05} 1,5 ц					

Преимущество нового сорта проявилось по числу бобов на одном растении и содержанию масла в семенах (см. табл.2), что способствует в конечном итоге увеличению сбора масла с 1 га.

В целях наиболее полного описания сортов сои, полученных методом культуры ткани, нами был проведен анализ их по экологической пластичности, что представляет интерес, как для теоретических исследований, так и для практической селекции.

Использование метода определения экологической пластичности сортов позволяет не только сравнить сорта по их средней урожайности, но и определить их реакцию на изменение условий, оценить их потенциальные возможности, отобрать сорта для возделывания при определенных уровнях урожайности и выделить генотипы наиболее стабильные в различных условиях среды.

Таблица 2
Некоторые биометрические и биохимические показатели сортов сои полученных методом культуры ткани (1996-1998 гг.)

№ п/п	Сорт	Высота		Число бобов	Масса 1000 семян, г	Период вегетации, дн.	Содержание, %	
		растения, см	прикрепления нижнего боба, см				масла	белка
1	Приморская 529, ст.	74,4	14,3	28,4	190	114	18,76	37,64
2	Ходсон, ст.	74,4	10,3	46,6	172	109	21,24	36,16
3	Приморская 1280	76,0	9,7	49,4	172	108	21,46	35,72
4	Приморская 1281	70,0	14,4	51,2	162	112	20,40	37,02
5	Приморская 1282	79,3	13,4	31,8	169	113	18,94	36,52
6	Приморская 1283	78,6	12,0	31,9	184	114	18,92	37,35
7	Приморская 1284	71,0	15,9	26,9	180	109	19,11	39,24

Для оценки взята урожайность, полученная за четыре года резко различающихся по метеорологическим показателям, где самым благоприятным был 1994 год, а самым неблагоприятным - 1995 год. Значительные коэффициенты регрессии (более 1,0) отмечены у сортов Приморская 1280, Приморская 1282, Приморская 1283 и предопределяют высокую их отзывчивость на условия произрастания (см. табл.3). Увеличение значений коэффициента регрессии (b_i) и варианты стабильности ($S^2 di$) указывают на отсутствие пластичности у сорта. Так, Приморская 1280 в благоприятные годы дает существенную прибавку урожая. Недобор активных температур, засуха или наличие других абиотических стрессов снижают продуктивность растений данного сорта, а следовательно, в конечном итоге, и его урожайность.

Экологическая пластичность сортов полученных
методом культуры ткани

№ п/п	Сорт	Урожайность, ц/га				Среднее	Параметры ста- бильности	
		1994	1995	1996	1997		bi	S'di
1	Приморская 1280	33,5	20,5	22,7	18,8	23,9	1,3	3,06
2	Приморская 1281	28,2	17,5	24,5	21,3	22,9	0,87	1,70
3	Приморская 1282	28,8	15,9	22,9	20,8	22,1	1,05	3,47
4	Приморская 1283	29,3	16,0	22,3	18,8	21,6	1,16	0,51
5	Приморская 1284	26,1	18,9	22,1	20,8	22,0	0,62	0,14
6	Приморская 529, ст.	27,1	17,8	20,6	18,5	21,0	0,86	6,26
7	Ходсон, ст.	29,6	17,7	17,6	17,9	20,7	1,13	4,29
	Сумма	124,3	152,7	136,9	202,6	22,02		
	Индексы условий испытания	6,92	-4,26	-0,21	-2,46			

Сорта с низким коэффициентом регрессии более стабильны и при изменении условий резкого снижения урожая не последует. К таковым относятся среди изучаемых две регенерантные линии: Приморская 1281 и Приморская 1284.

В условиях муссонного климата Приморья очень важное значение приобретает в формировании урожая устойчивость к листовым формам грибных заболеваний. Изучаемые сорта отнесены нами к двум различным группам спелости (см. табл. 2). В группе среднепоздних сортов стандартом является Приморская 529, испытываемые сорта - Приморская 1281, Приморская 1282, Приморская 1283. Остальные две формы Приморская 1280 и Приморская 1284 - среднеранние, стандартом для них взят сорт Ходсон. Сорта различных групп спелости изучали на жестком инфекционном фоне.

Среди среднепоздних сортов выделился Приморская 1281, который по результатам испытания характеризуется как толерантный к *Cercospora sojae* Нага и *Pegonospora manshurica* (Naum) Syd. Поскольку при равной степени поражаемости он превосходит стандартный сорт Приморская 529 по урожайности на 2,7 ц/га. Относительно устойчивым он определен к возбудителю одного из самых вредоносных грибных заболеваний в Приморском крае *Septoria glycinis* Hemmi.

В группе среднеранних сортов менее подверженным к грибным заболеваниям оказался сорт Приморская 1284. Листовая поверхность его растений на 33% меньше, чем у стандарта Ходсон поражалась церкоспорозом и на 17% - пероноспорозом.

В результате всестороннего изучения и анализа полученной информации по соматональным регенеративным линиям сои, созданным методом культуры ткани, выделился сорт Приморская 1281. При равных показателях периода вегетации и экологической пластичности (коэффициент регрессии 0,87) он превосходит стандарт Приморская 529 по урожайности, содержанию масла в семенах, устойчивости к септориозу. Получен он методом тканевой культуры на основе соматональной изменчивости. В качестве первичного экспланта использована ткань семядоли недозрелого зародыша сорта Мечта. Семена его крупнее исходной формы, масса 1000 семян на 11% выше, растения на инфекционном фоне оказались устойчивее (в среднем за 3 года) к септориозу на 16%, церкоспорозу на 14%. В семенах данного сорта выше, чем у Мечты содержание белка -37,02% против 35,14%. Созревает новый сорт на 2-3 дня позже исходною. Первичные экспланты - ткань семядолей недозрелых зародышей сорта Приморская 1281 оказались более отзывчивы на инициацию регенерации *in vitro*. Массовое образование эмбрионидов началось через 14 дней, у исходной формы сорта Мечта лишь на 20 день. Кроме того, 55% первичных эксплантов сорта Мечта образовали зародышевые структуры, в то время как у Приморской 1281-74,3%. Этот показатель превысил значение сорта Ходсон (62,5%), который многие годы исследований характеризовался как наиболее продуктивный.

Наряду с вышеуказанными преимуществами новый сорт проявил высокую экологическую пластичность (коэффициент регрессии-0,87) в отличии от исходной формы сорта Мечта (ранее нами создан методом сложной гибридизации), который относится в свою очередь к группе высокоотзывчивых к условиям произрастания сортов (коэффициент регрессии - 1,67). Мы полагаем, что такой положительный "отпечаток" в виде устойчивости к абиотическим стрессам (засуха, высокие или пониженные температуры и т.д.) наложили условия культивирования *in vitro*.

В 1999 году сорт передан в Государственную комиссию Российской Федерации по испытанию и охране сельскохозяйственных достижений.

Литература

1. Orton T.S. Somaclonal variation: Theoretical and practical considerations // *Gene Manipulation in Plant Improvement* / Ed. Y.P. Gustafson. - London, New York: Plenum, 1984. - P. 427-468. :
2. Rice T. B. Proceedings of the thirty - seventh annual corn and sorghum industry research conference/ American Seed Trade Association. - Washington, D.C., 1982-P. 148-162.
3. Сомаклональная изменчивость / Витанова З., Влахова М., Денчев П., Маринова Е., Витанов В., Атанасов А. // *Физиология и биохимия культурных растений* - 1990. - Т.22, №5, - С. 412 - 426.
4. Долгих Ю., Шамина З. Современные представления о причинах и механизмах соматоклональной изменчивости // *Молекулярные механизмы генетических процессов: Сб. докл. VII Всесоюз. симп. (г. Москва, 27-30 марта 1990 г.)*. - М.: Наука, 1991. - С. 123-127.
5. Константинов Ю., Ривкин М. Возможный свободнорадикальный механизм возникновения соматоклональной изменчивости у растений // *Молекулярные механизмы генетических процессов: Сб. докл. VII Всесоюз. симп. (г. Москва, 27-30 марта 1990 г.)*. - М.: Наука, 1991. - С. 127-130.
6. Barwale U.B., Widholm Y.M. Somaclonal variation in plants regenerated from cultures of soybean // *Plant Cell Reports*. - 1987. - Vol.6 - P. 365-368.
7. Graybosh P.A., Edge M.E., Delannay X. Somaclonal Variation in Soybean Plants Regenerated from the Coteledonary Node Tissue Culture Sistem // *Crop Sci.* 1987. Vol.27, № 4. - P.803-806.
8. Somaclonal Variation in Soybean Plants Regenerated from tissue cultures / H. Freytag, A.P. Rao - Arelli. S.C. Anand e.a. // *Plant Cell Repts*. - 1989. -Vol.8, №4. -P. 199-202.
9. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. - М.: Наука, 1964. - 272 с.
10. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полешук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. - Киев: Наукова думка, 1980. - 489 с.
11. Initiation and propogation of *Glycine max. L. Merr.*: Plant from tissue - cultured epicotuls / Write M.S., Williams M.H., Pierson P.E., Carnes

- M.G. // Plants Cell, Tissue and Organ cultures - 1987., № 8. - P. 83-90.
12. Murashige T., Scoog F. A revised medium for rapid growth and biosays with tobacco tissue cultures // Phisiol plant. - 1962. - Vol. 15, № 13. - P. 473-497.
 13. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cells // Experimental cell research. - 1969. - Vol. 50, n. 1. -P. 151-158.
 14. Доспехов Б. А. Методика полевого опыта. - 3-у изд., перераб. и доп. - М.: Колос, 1973. -336 с.
 15. Пакудин В.З., Лопатина П.М. Методы оценки экологической пластичности сортов сельскохозяйственных растений // Проблемы отбора и оценки селекционного материала. - Киев, 1980. - С. 93-100.

УДК 631.5:633.853.52.001

ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ТЕХНОЛОГИИ ВОЗДЕЛЫВАНИЯ СОИ В АМУРСКОЙ ОБЛАСТИ

С.В. Рафальский, А.Н. Гайдученко, И.Г. Ковшик,
ВНИИ сои.

Соя – одна из основных сельскохозяйственных культур в мире, за счет которой возможно решить проблему белка в питании человека и кормлении животных.

В связи с этим технологиям ее возделывания уделяется большое внимание во многих регионах России. На Дальнем Востоке соя выращивается давно, однако к массовому ее возделыванию земледельцы приступили во второй половине двадцатых годов прошлого столетия.

В настоящее время в Дальневосточном регионе производится свыше 70% всей сои. Почвенно-климатические условия зоны соевых не однородны и это требует разработки агротехнических приемов возделывания этой культуры для каждой микрозоны.

Вместе с тем на Дальнем Востоке сложилась общая базовая технология возделывания сои, соблюдение которой обеспечивает доста-