

Интродукция и селекция

УДК 631.52:633.31(571.56-191.2)

Клональное микроразмножение и селекция *Medicago varia* в условиях Центральной Якутии

Н.С. Строева, В.Г. Дарханова, И.В. Воронов, Г.В. Филиппова

Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, 677980, Якутск, пр. Ленина, 41, Россия
e-mail: viv_2002@mail.ru

Аннотация. Создание хозяйственно-ценных высокоурожайных сортов растений, устойчивых к болезням, вредителям и к почвенному засолению и обладающих высокой репродуктивной способностью, в том числе с признаками повышения качества кормовой базы для сельскохозяйственных животных, является одной из задач биотехнологии растений. При этом в условиях Якутии необходимо сохранять и увеличивать высокую засухоустойчивость и холодостойкость, быстрое отрастание весной и после скашивания, высокую семенную продуктивность используемых сортов. В этой связи целью исследования было получение растений-регенерантов *in vitro* индукцией каллусогенеза листовых эксплантов из апекса и почек люцерны изменчивой (*Medicago varia* Mart.) сортообразца «Сюлинская», направленное на расширение генетического разнообразия и селективного отбора по хозяйственно-ценным признакам. Научная новизна исследований заключалась в разработке метода введения в культуру *in vitro* многолетнего травянистого растения люцерны изменчивой. В качестве исходного экспериментального материала были использованы семена люцерны. В работе применялись общепринятые методы клонального микроразмножения с использованием культуры клеток и тканей. В ходе исследования из апекса и почек в условиях *in vitro* были получены растения-регенеранты люцерны с высоким регенерационным потенциалом. Выявлено, что высокое значение показателя корневого индекса (КИ) растений-регенерантов 6, 8 и 9-го пассажа обуславливает высокий процент выживаемости регенерантов при предварительном процессе адаптации в условиях *ex vitro*. Полученные *in vitro* растения-регенеранты люцерны являлись высококачественным посадочным материалом, превосходящим исходный сортообразец по продуктивности надземной массы растения, семян и признакам фертильности. Исследования показали, что первое поколение растений, полученное от растений-регенерантов по методу поликросс, по хозяйственно-ценным характеристикам достоверно не отличалось от контрольных растений, между тем, были отмечены наиболее перспективные особи для проведения дальнейшего селекционного процесса.

Ключевые слова: *Medicago varia*, клональное микроразмножение, растения-регенеранты, селекция, Центральная Якутия.

Clonal Micropropagation and Breeding of *Medicago Varia* under Conditions of Central Yakutia

N.S. Stroeve, V.G. Darkhanova, I.V. Voronov, G.V. Filippova

Institute for Biological Problems of Cryolithozone SB RAS, 41, Lenina Ave., Yakutsk, 677980, Russia
e-mail: viv_2002@mail.ru

Abstract. One of the tasks of plant biotechnology is to create economically valuable high-yielding plant varieties resistant to diseases, pests, and soil salinization, featuring high reproductive ability and pos-

СТРОЕВА Наталья Семеновна – инженер I категории; ДАРХАНОВА Валентина Гаврильевна – инженер I категории; ВОРОНОВ Иван Васильевич – к.б.н., с.н.с.; ФИЛИППОВА Галина Валерьевна – к.б.н., с.н.с.

sessing the signs of improved forage quality for farm animals. At the same time, the conditions of Yakutia necessitate to maintain and enhance the following characteristics in existing varieties: high drought and cold resistance, rapid re-growing in spring and after mowing, as well as high seed productivity. In this regard, the aim of the study was to obtain the regenerant plants in vitro by induction of callus genesis of leaf explants, from apex and buds of Medicago varia Mart, of Syulinskaya variety in order to increase genetic variety and selection of economically valuable parameters. The scientific novelty of the study was the development of a method of introduction to in vitro culture of the perennial herb species Medicago varia. Lucerne seeds were used as an initial experimental material. The standard methods of clonal micropropagation with use of cell and tissue cultures were applied. During the study lucerne plants-regenerants with high regeneration potential were received from apex and buds in vitro conditions. It is revealed that high value of the root index (RI) of plants-regenerants of 6, 8 and 9 passages causes high percent of survival of the regenerants at preliminary process of adaptation in ex vitro conditions. The obtained in vitro regenerant plants of lucerne appeared to be high-quality planting material exceeding the original variety in productivity of top and seeds, as well as in fertility characteristics. The results of the study state that economically valuable characteristics of the first generation obtained from regenerant plants by polycross method did not differ significantly from control plants. However, the most promising specimens were picked out for further selection process.

Key words: *Medicago varia*, clonal micropropagation, regenerant plants, selection, Central Yakutia.

Введение

Первые работы в области клонального микро размножения были проведены в конце 50-х годов XX в. Жоржем Морелем [1]. В СССР работы по клональному микро размножению были начаты в 60-х годах под руководством профессора Р.Г. Бутенко. Первые успехи в клональном микро размножении связаны с культивированием апикальных меристем на соответствующих питательных средах, обеспечивающих в конечном итоге получение растений-регенерантов [2, 3]. Клональное микро размножение позволяет за короткий срок получить большое количество однородного посадочного материала растений. Коэффициент микро размножения достигает 10^5 – 10^6 растений в год, что в несколько тысячи раз больше, чем при использовании традиционных методов вегетативного размножения. Этот метод значительно ускоряет селекционный процесс, кроме того, при размножении растений в культуре тканей происходит их освобождение от патогенных микроорганизмов и во многих случаях от вирусов [4].

В культуре тканей можно поддерживать рост растений круглый год, что важно для растений, имеющих в цикле своего развития период покоя. При выращивании растений с длительной ювенильной к репродуктивной фазе развития методом культуры тканей удается размножить растения, которые с трудом или совсем не размножаются вегетативно [5].

Перед селекционерами стоит задача создать высокоурожайные сорта люцерны, устойчивые к болезням, вредителям и к почвенному засолению, обладающие высокой репродукционной способностью; с признаками повышения качества кормовой базы сельскохозяйственных жи-

вотных. При этом необходимо сохранить и увеличить высокую засухоустойчивость и холодостойкость, быстрое отрастание весной и после скашивания, повышенную семенную продуктивность сортов, используемых в животноводстве.

Цель исследования – получение растений-регенерантов *in vitro* индукцией каллусогенеза листовых эксплантов из апекса и почек люцерны изменчивой сортообразца «Сюлинская», направленное на расширение генетического разнообразия многолетних травянистых растений и селективного отбора по хозяйственно-ценным признакам.

Научная новизна исследований: впервые в Якутии разработана методика введения в культуру *in vitro* многолетнего травянистого растения люцерны изменчивой, направленная на расширение генетического разнообразия. Индивидуально отобранные растения и перспективные образцы будут передаваться в селекционный процесс для проведения сортоотбора.

Материал и методы

В качестве исходного экспериментального материала были использованы семена люцерны «Сюлинская», относящиеся к виду *Medicago varia* Mart. – люцерна изменчивая. Род люцерны *Medicago* L. принадлежит семейству бобовых – *Fabaceae* Lindl. (*Leguminosae* Juss., *Papilionaceae* Giseke). Люцерна сортообразец «Сюлинская» характеризуется комплексом хозяйственно-ценных признаков: зимостоек, скороспел, засухоустойчив, холодостоек, высокотехнологичен из-за прямостоячей формы куста. Урожай сена в пределах 40–50 ц/га без орошения, урожай семян в условиях криолитозоны достаточно высок – 1,5–2,5 ц/га [6].

В работе применяли общепринятые методы культуры клеток и тканей, согласно рекомендациям [7, 8]. При получении растений-регенерантов из апекса, почек и побегов люцерны были использованы методики, разработанные СибНИИ кормов [9, 10], для индукции каллусообразования листовых эксплантов – методику [11].

При введении люцерны в культуру *in vitro* применяли способ поверхностной стерилизации зрелых семян: 70 %-м этанолом 1 мин, затем 10 %-м раствором хлорамина Б в течение 30 мин. После дезинфекции семена тщательно промывали автоклавированной дистиллированной водой и проращивали в асептических условиях на агаризованной среде. Экспланты из листьев, апекса и почек помещали на питательные среды Гамборга В5 и 1/2 В5, с добавками витаминов и фитогормонов [12].

Условия культивирования культуры тканей растений: температура 20 °С, дополнительная освещенность 3 тыс. лк, 16-часовой фотопериод. При определении значимости полученных результатов использовали критерии Фишера, Стьюдента и непараметрические критерии статистики [13,14].

Полевые исследования проводились в 2006–2010 гг. на территории стационара «Мархинский» Института биологических проблем криолитозоны СО РАН, расположенного в 13 км от г. Якутска на надпойменной террасе р. Лена. Оценка теплого периода условий произрастания исследуемых растений проводили по гидротермическому коэффициенту (ГТК), рассчитываемому по формуле:

$$\text{ГТК} = \frac{\sum R}{0,1 \sum T \geq 10^{\circ}\text{C}},$$

где $\sum R$ – сумма осадков за месяцы; $\sum T$ – сумма среднесуточных значений температуры воздуха больше 10 °С. При расчете физиологических показателей закладывали 5 % ошибку на метод.

Результаты и обсуждение

В результате реализации лабораторной части исследования в среднем было проведено 6–7 пассажей культуры клеток растений, включая 2–5 циклов регенерации и несколько процедур клонирования. В ходе работы выявлено, что количество пассажей исследованного материала можно проводить 11 раз и более (табл. 1).

При этом следует учесть, что увеличение числа пассажей приводит к увеличению длины междоузлий растений-регенерантов, а адаптация к почвенным условиям проходит более длительное время. Следует отметить, что одним из самых трудных этапов в клональном размножении растений является перевод из асептических условий в почвенные условия культивирования. При этом растения-регенеранты находятся в стрессовом состоянии, обусловленном адаптацией к условиям *ex vitro*, в том числе изменением влажности воздуха и среды культивирования.

Известно, что развитие надземной части и корневой системы растения взаимосвязано и взаимозависимо. Диагностический показатель при идентификации устойчивости регенерантов к стрессу, оцениваемый по отношению средняя длина корня в пассаже к средней высоте растений – корневой индекс, показал, что при низких его значениях наблюдается невысокий процент выживаемости регенерантов, высаженных в почвенные условия при предварительном процессе адаптации в почвенных стаканчиках. Вследствие этого для проведения дальнейшей работы выделяли растения-регенеранты 6, 8 и 9-го пассажа. В период промежуточного этапа культивирования в стаканчики с почвой были высажены растения-регенеранты (R_0) люцерны с 6–12 листьями, с высотой побега 7–10 см и 6–8 корнями с длиной 5–6 см. Выживаемость растений-регенерантов на 30-й день наблюдения в среднем составляла 56 %. После 2-недельного периода адаптации к автотрофному питанию

Т а б л и ц а 1

Развитие регенерантов люцерны *in vitro* в зависимости от числа пассажей и их корневой индекс ($p < 0,05$)

Число пассажей	Высота, см	Число листьев	Длина корней, см	Корневой индекс, длина корней/высота растений	Выживаемость в почвенных стаканчиках, %
2	6,5±0,3	10±0,5	4,0±0,2	0,6	51±2,6
3	9,8 ±0,5	8±0,4	5,5±0,3	0,6	50±2,5
4	10,6±0,5	9±0,5	5,8±0,3	0,6	49±2,5
5	12,3±0,6	7±0,4	7,5±0,4	0,6	50±2,5
6	11,8±0,6	7±0,4	9,9±0,5	0,8	59±3,0
7	12,6±0,6	6±0,3	7,3±0,4	0,6	51±2,6
8	11,5±0,6	6±0,3	8,2±0,4	0,7	56±2,8
9	11,8±0,6	7±0,4	8,6±0,4	0,7	55±2,8
10	12,2±0,6	8±0,4	7,3±0,4	0,6	50±2,5
11	17±0,9	8±0,4	6,7±0,3	0,4	40±2,0

301 растение-регенерант люцерны (2005 г.) пересаживали в полевые питомники с площадью питания 0,36 м². Отмечалась 40 %-я гибель растений-регенерантов, вызванная стрессом и реакцией на новые условия произрастания.

За период 2006–2008 гг. у исследуемых растений-регенерантов R₀ люцерны в течение вегетационного периода определяли морфологические и хозяйственные признаки. Установлено, что по морфологическим признакам растения-регенеранты R₀ характеризуются большей изменчивостью по сравнению с контролем. В результате были выявлены и отобраны четыре формы люцерны изменчивой, превосходящие исходный сортообразец по продуктивности надземной массы растения, семян и признакам фертильности, заложен питомник поликросса для селекционной работы (табл. 2).

В 2006 г. высота растений отобранных регенерантов люцерны R₀ была выше в 1,3–1,8 раза по сравнению с контрольными растениями. По количеству стеблей на кусте выделились R₀ №2 и №25, по сравнению с контролем этот показатель был в 1,5 раза выше. По количеству побегов на стебле и соцветий выделялся вариант R₀ №2, который в 1,3 и 2,0 раза, соответственно, был выше значений относительно контрольных растений. Можно предположить, что такие формы представляют интерес для увеличения и эффективности использования зеленой массы. В первый год у регенерантов R₀ №16 и №72 было максимальное количество семян в бобе и превышало в 2,0–2,3 раза данный показатель по сравнению с контролем. Число плодов на реге-

нерантах R₀ было низким, исключением был регенерант R₀ №2, у которого данный показатель статистически не отличался от контроля. Масса семян на растении у регенерантов R₀ №2 и №16 была выше в 3,1 и 3,9 раза, соответственно, относительно контроля. Зеленая биомасса регенеранта R₀ №2 на 10 % была выше по сравнению с контролем, у остальных вариантов она была снижена в 1,4–2,5 раза.

Следует отметить, что в 2006 г. агрометеорологические условия были наиболее благоприятными для роста и развития исследованных растений-регенерантов R₀, значение ГТК составило 1,2 (табл. 3) [15, 16].

Погодные условия вегетационных периодов 2006–2008 гг. значительно отличались и охватывали все особенности природно-климатических условий Центральной Якутии. За период проведения исследований наиболее увлажненным был 2006 г. (ГТК 1,2), умеренно-влажным и теплым был 2007 г. (ГТК 0,9) и крайне засушливым был 2008 г. (ГТК 0,6), что повлияло на продуктивность исследованных регенерантов.

Растения-регенеранты R₀ перед уходом в зиму 2006 г. были хорошо развитыми, находились в фазе массового цветения и плодоношения, высота достигала 59–92 см. Все растения достаточно хорошо переносили зиму, за все годы испытания в питомнике перезимовка составляла 100 %.

Первое поколение растений-регенерантов R₁ люцерны (семена, собранные в 2006 г. с растений R₀ в периоды наблюдений 2008–2010 гг.) по хозяйственным характеристикам не уступало первому поколению контрольных растений (табл. 4).

Т а б л и ц а 2

Морфологическая характеристика растений-регенерантов люцерны (R₀) в фазе массового цветения и плодоношения (2006–2007 гг.), (p < 0,05)

№ R ₀	Год	Высота, см	Кол-во стеблей, шт.	Кол-во побегов на стебле, шт.	Кол-во соцветий, шт.	Число семян в бобе, шт.	Число плодов, шт.	Масса семян на раст., г	Зеленая масса, г
2	2006	90±5	32±2	736±37	3264±163	4±0,2	1682±84	25±1,2	541±27
	2007	105±5	45±2	765±38	3006±150	3±0,2	9180±460	29±1,5	700±35
	2008	75±4	13±1	180±9	509±25	4±0,2	2635±132	8±0,4	106±5
16	2006	92±5	21±1	352±18	1117±56	9±0,5	760±40	31±2,0	351±17
	2007	95±5	25±1	310±16	850±43	5±0,3	4940±250	17±1,0	420±20
	2008	77±4	17±1	233±12	689±34	5±0,3	1812±91	7±0,4	186±9
25	2006	76±4	32±2	358±18	1523±76	4±0,2	1130±60	8±0,4	262±13
	2007	75±4	38±2	509±25	1224±61	4±0,2	10430±520	16±1,0	400±20
	2008	72±4	17±1	214±11	606±30	5±0,3	2820±140	12±1,0	131±6
72	2006	94±5	20±1	256±13	652±33	8±0,4	620±31	8±0,4	201±10
	2007	95±5	18±1	234±12	417±21	5±0,3	4400±220	18±1,0	200±10
	2008	73±4	14±1	184±9	456±23	5±0,3	2223±111	6±0,3	122±6
Контроль	2006	59±3	22±1	558±28	1604±80	4±0,2	1550±78	8±0,4	490±25
	2007	76±4	25±1	301±15	2531±127	4±0,2	10640±532	23±1,0	723±36
	2008	70±4	17±1	230±12	521±26	5±0,3	1934±97	9±0,5	87±4

Т а б л и ц а 3

Агрометеорологические условия вегетационного периода 2006–2010 гг.

	2006 г.	2007 г.	2008 г.	2009 г.	2010 г.
Начало периода	21,05	14,05	10,05	25,05	8,05
Конец периода	31,08	17,09	03,09	9,09	13,09
Продолжительность дней	103	113	111	108	129
Сумма температур воздуха, °С	1679	1798	2006	1907	2220
Среднесуточная температура воздуха, °С	16,3	15,9	18,1	17,7	17,2
Всего осадков, мм	196,0	160,6	120,0	82,8	129,9
Число дней с осадками	28	34	22	21	22
Сумма осадков 5 мм в сутки, мм	71,0	129,0	67,3	72,6	80,7
Число дней с осадками 5 мм за сутки	12	10	6	7	10
Среднее значение ГТК	1,2	0,9	0,6	0,5	0,5

Т а б л и ц а 4

Характеристика высокопродуктивных линий R₁ растений-регенерантов люцерны за 2008–2010 гг. (p < 0,05)

№ R ₁	Год	Высота, см	Кол-во стеблей, шт.	Кол-во побегов на раст., шт.	Кол-во соцветий, шт.	Число семян в бобе, шт.	Число плодов, шт.	Масса семян на раст., г	Зеленая масса, г
2	2008	75±4	15±1	180±9	510±25	4±0,2	2640±130	8±0,4	110±5
	2009	69±3	16±1	240±12	450±23	5±0,3	2810±140	6±0,3	100±5
	2010	65±3	17±1	260±13	470±24	6±0,3	5210±260	8±0,4	160±8
16	2008	77±4	17±1	230±12	690±34	5±0,3	1810±90	7±0,4	190±9
	2009	73±4	14±1	190±9	340±17	5±0,3	2060±100	6±0,3	90±4
	2010	65±3	15±1	180±9	420±21	6±0,3	5800±290	7±0,4	120±6
25	2008	72±4	17±1	210±11	610±23	5±0,3	2820±140	12±0,6	130±7
	2009	67±3	21±1	270±14	450±23	5±0,3	2380±120	3±0,2	120±6
	2010	75±4	21±1	250±13	420±21	6±0,3	4900±250	5±0,3	160±8
72	2008	73±4	14±1	180±9	460±23	5±0,3	2220±110	6±0,3	120±6
	2009	72±4	13±1	180±9	280±14	6±0,3	2170±110	7±0,4	80±4
	2010	78±4	12±1	170±9	444±22	6±0,3	4570±230	6±0,3	120±6
F ₁ Контроль	2008	70±3	17±1	310±16	520±26	5±0,3	2930±150	9±0,5	90±4
	2009	65±3	22±1	300±15	500±25	5±0,3	3430±170	4±0,2	100±5
	2010	70±3	18±1	190±9	380±19	6±0,3	4090±200	8±0,5	130±7

За весь период эксперимента у всех растений R₁ не было зафиксировано статистически значимых отличий по показателю высота растения относительно контрольного варианта. За исключением R₁ №72, у которого в 2010 г. высота растения была выше на 11 % по сравнению с контрольными растениями. В 2008 г. показатель количества стеблей у всех растений R₁ не отличался от контроля. В 2009 г. наблюдалось снижение количества стеблей на 27 %, 36 % и 40 % у R₁ №№ 2, 16 и 72, соответственно, относительно контроля. В 2010 г. у R₁ №16 и №72 так же сохранялось снижение количества стеблей на 17 % и 33 % относительно первого поколения контрольных растений. Следует отметить вариант R₁ №25, у которого наблюдалось повышение количества стеблей на 17 % относительно контроля.

За период исследования 2008 и 2009 гг. у первого поколения регенерантов наблюдалось сниженное количество побегов на стебле по

сравнению с контролем. В 2010 г. у R₁ №25 отмечалось повышение данного показателя в 1,3 раза. Количество соцветий в 2008 г. у R₁ №16 и №25 превышало контрольные в 1,3 и 1,2 раза, соответственно. В 2009 г. наблюдалось снижение в 1,5 и 1,8 раза количества соцветий у R₁ №16 и №72, соответственно. У растений R₁ №2 и №25 количество соцветий на кусте не отличалось от контроля. В 2010 г. у первого поколения регенерантов люцерны количество соцветий не отличалось от контроля.

В 2008–2009 гг. у всех изученных растений первого поколения было зафиксировано минимальное число плодов на растении относительно контрольных растений, за исключением R₁ №25 (2008 г.), количество плодов у которого не отличалось от контроля. В 2010 г. число плодов на растении у всех изученных растений первого поколения было выше в 1,1–1,4 раза относительно контрольного варианта.

Масса семян на растении в 2008 г. у всего первого поколения регенерантов была снижена, за исключением №25, у которого наблюдалось увеличение данного показателя в 1,3 раза относительно контрольных. В 2009 г. отмечалось увеличение массы семян в 1,5–1,8 раза, за исключением №25, у которого наблюдалось снижение массы семян на 25 % по сравнению с контрольными значениями. В 2010 г. у первого поколения наблюдалось снижение массы семян в 1,1–1,6 раза, за исключением №2, у которого масса семян не отличалась от контроля.

Зеленая биомасса растений первого поколения регенерантов в 2008 г. была выше контрольных в 1,2–2,1 раза. В 2009 г. зеленая биомасса снижалась у R₁ №16 на 10 % и №72 на 20 % относительно контроля. В варианте R₁ №25 биомасса была на 20 % выше, а №2 не отличалась от контроля. В 2010 г. у растений R₁ №2 и №25 наблюдалось увеличение биомассы растений на 23%, в вариантах R₁ №16 и №72 было отмечено снижение на 8% зеленой биомассы относительно контрольного варианта.

Следует отметить, что с 2008 по 2010 г. агрометеорологические условия были неблагоприятными для роста и развития люцерны, вегетационный период был засушливым, значение ГТК составило 0,5–0,6, что отрицательно повлияло на продуктивность исследованных растений.

Заключение

1. Из апекса и почек *in vitro* были получены растения-регенеранты люцерны изменчивой сортообразца «Сюлинская» с высоким регенерационным потенциалом.

2. Высокое значение показателя корневого индекса растений-регенерантов 6, 8 и 9-го пассажа обуславливает высокий процент выживаемости регенерантов при предварительном процессе адаптации в условиях *ex vitro*.

3. Полученные *in vitro* растения-регенеранты люцерны изменчивой сортообразца «Сюлинская» являются высококачественным посадочным материалом, превосходящим исходный сортообразец по продуктивности надземной массы растения, семян и признакам фертильности.

4. В первом поколении растений, полученных от растений-регенерантов по методу поликросс, были выделены особи с наиболее высокими хозяйственно-ценными характеристиками.

Работа выполнена в рамках проекта АААА-А17-117020110056-0 «Фундаментальные и прикладные аспекты изучения разнообразия растительного мира Северной и Центральной Якутии».

Литература

1. Morel G. Biochemistry of morphogenesis of plant shoots Proc. IV Internat. Congr. Biochem. 1959. VI. P. 221–222.
2. Сельскохозяйственная биотехнология: Учебник / В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, Е.С. Воронин [и др.]. М.: Высшая школа, 2003. 469 с.
3. Эмбриология растений: использование в генетике, селекции, биотехнологии / Под ред. И.П. Ермакова; пер. с англ.: Т.Б. Батыгиной, В.Е. Васильевой, З.И. Никитичевой, Н.П. Матвеевой, Г.И. Савиной. Т. 1. М.: Агропромиздат, 1990. 508 с.
4. Муравлев А.А. Методические рекомендации по получению растений *in vitro* из соматической ткани рапса/А.А. Муравлев, М.В. Баевская, О.П.Стрижак, А.Е. Фомина // Кормопроизводство. 2010. № 9. С. 3–7.
5. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. М., 1983. 96 с.
6. Денисов В.Г., Стрельцова В.С. Люцерна в Якутии. Новосибирск, 2000. 198 с.
7. Бутенко Р.Г. Индукция морфогенеза в культуре тканей растений // Гормональная регуляция онтогенеза растений. 1984. С. 42–54.
8. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. Киев: Наукова думка, 1980. 399 с.
9. Мезенцев А.В. Методические указания по регенерации и размножению люцерны с использованием культуры тканей, клеток и протопластов. М., 1980. 25 с.
10. Рожанская О.А., Свежинцева Е.А. Получение и отбор соматоклональных вариаций для селекции рапса: Метод. рекомендации / СО РАСХН. СибНИИ кормов. Новосибирск, 1991. 28 с.
11. Строева Н.С., Дарханова В.Г. Получение растений-регенерантов *Medicago varia* индукцией каллусообразования листовых эксплантов в культуре *in vitro* // Наука и образование. 2017. № 1. С. 110–113.
12. Gamborg O.L. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cell / O.L. Gamborg, R.A. Miller, K. Ojima // Exp. Cell Res. 1968. Vol. 50. P. 151–158.
13. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991. 217 с.
14. Зайцев Г.Н. Методика биометрических расчетов. М.: Наука, 1973. 256 с.
15. <http://www.pogodaiklimat.ru>.
16. <https://www.gismeteo.ru/weather-yakutsk-4039>.

Поступила в редакцию 30.05.2017