

УДК 635.655
ГРНТИ 68.35.31

DOI: 10.24411/1999-6837-2018-14094

Фисенко П.В., канд. биол. наук, науч. сотр.;
Ефремова О.С., канд. с.-х. наук, ст. науч. сотр.,
Федеральный научный центр агrobiотехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки,
пос. Тимирязевский, Уссурийский район, Приморский край, Россия
E-mail: fe.smc_rf@mail.ru;
Кодирова Г.А., канд. техн. наук, вед. науч. сотр.,
Всероссийский научно-исследовательский институт сои,
г. Благовещенск, Амурская область, Россия
E-mail: valsин09@gmail.com

ВЛИЯНИЕ ИСХОДНОЙ ФОРМЫ НА ГЕНЕТИЧЕСКУЮ ИЗМЕНЧИВОСТЬ МУТАНТНЫХ ЛИНИЙ СОИ¹

© Фисенко П.В., Ефремова О.С., Кодирова Г.А., 2018

В статье представлены результаты исследования биохимического состава семян и генетической изменчивости мутантных линий сои, полученных с использованием ионов кадмия и меди. Исследования проводили в лаборатории сельскохозяйственной биотехнологии ФГБНУ «ФНЦ агrobiотехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайка». На основании полученных данных и литературных источников показано влияние генотипа исходной формы на генетическую изменчивость полученных линий. Использование в качестве дополнительного мутагенного фактора ионов кадмия оказало влияние на биохимический состав семян сои. Регенерантные линии превысили показатели содержания в семенах масла, олеиновой и линолевой кислот. При этом снизилось содержание линоленовой кислоты, что улучшает качественный состав соевого масла. Регенерантная линия R 1584 выделена как лучшая по некоторым, достоверно превышающим стандарт, признакам: масло – 7%, линолевая кислота – 1,6%, линоленовая – ниже на 16,7%. В результате ПЦР выявлено 54 фрагмента, 10 из которых оказались полиморфны. Все исследуемые методом ISSR линии имели генетические различия, как с исходной формой, так и друг с другом. Наибольшие дистанции выявлены между исходной формой и линией R1584, а также между парами линий R1568/R1584 и R1584/R1577. Наименьшее значение генетических различий выявлено между линиями R1568 и R1577. Установлено влияние на генетическую изменчивость исследуемых образцов таких факторов как природа используемого иона и генотип исходной формы. Выбор исходной формы оказывает наибольшее влияние на генетическую изменчивость полученных линий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ТЯЖЕЛЫЕ МЕТАЛЛЫ (ИОНЫ), *IN VITRO*, МУТАГЕННЫЙ ФАКТОР, СЕМЯДОЛЬНЫЙ УЗЕЛ, СЕЛЕКТИВНАЯ СРЕДА, РЕГЕНЕРАЦИЯ, ГЕН, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ.

UDC 635.655

Fisenko P.V., Cand. Bio. Sci., Research Worker;
Efremova O. S., Cand. Agr. Sci., Senior Research Worker,
Federal Scientific Center for Agrobiotechnology in the Far East named after A. K. Chaika,
Timiryazevsky, Ussuriysk District, Primorsky Krai, Russia,
E-mail: fe.smc_rf@mail.ru;
Kodirova G.A., Cand. Tech. Sci., Leading Research Worker,
All-Russian Research Institute of Soybean,
Blagoveshensk, Amur Region, Russia
E-mail: valsин09@gmail.com

THE INFLUENCE OF THE INITIAL SHAPE AT THE GENETIC VARIABILITY OF THE MUTANT LINES OF SOYBEAN

The article presents the findings of investigation on the seeds biochemical composition and genetic variability of soybean mutant lines obtained with the help of cadmium and cuprum ions. The

¹ Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных научных исследований ДВО РАН «Дальний Восток» № 18-5-008.

research was carried out in the laboratory of Agricultural Biotechnology of the Federal Scientific Centre for Agrobiotechnology in the Far East named after A. K. Chaika. Findings and literature sources showed initial form genotype effect upon genetic variability of the obtained lines. The use of cadmium ions as an additional mutagenic factor influenced the biochemical composition of soybean seeds. Regenerant lines exceeded content of oil, oleic and linoleic acids in seeds. At the same time the content of linolenic acid reduced, which improved the quality of soybean oil. Regenerant line R 1584 was marked as the best one according to some features significantly exceeding the standard: oil – 7%, linoleic acid – 1,6%, linolenic acid-lower by 16,7%. As a result of PCR (polymerase chain reaction), 54 fragments were revealed, 10 of which were polymorphic. All the lines studied by the ISSR analysis had genetic differences both with the initial form and with each other. The greatest distances were found between the initial form and the line R1584, as well as between the pairs of lines R1568/R1584 and R1584/R1577. The least value of genetic differences was found between the lines R1568 and R1577. The influence of such factors as the nature of the ion used and the genotype of the initial form upon the genetic variability of the samples was found. The choice of the initial form has the greatest effect upon the genetic variability of the obtained lines.

KEY WORDS: HEAVY METALS (IONS), IN VITRO, THE MUTATION FACTOR, COTYLEDONARY NODE, SELECTIVE ENVIRONMENT, REGENERATION, GENE, GENETIC VARIABILITY.

Введение. Индуцированный мутагенез – один из методов расширения генетического разнообразия организмов [1-5]. Известно, что накопление металлов в молекулах нуклеиновых кислот приводит к нарушению функционирования клеток и может быть причиной ионного стресса у растений [1,6-12]. В связи с этим, для получения нового исходного материала в целях выделения ценных генотипов, наряду с классическим методом – гибридизацией, используются возможности создания *in vitro* данных форм с применением в питательных средах ионов тяжелых металлов как мутагенного фактора.

Узкий спектр исследований по сое в изложенном направлении подтверждает необходимость проведения экспериментов по использованию тяжелых металлов в качестве селективного фона *in vitro* при работе с культурой ткани в условиях расширения генотипической изменчивости хозяйственно ценных и адаптивных признаков сои. Молекулярно-генетические маркеры являются современным инструментом исследования генетического разнообразия, и позволяют оперативно выявлять генетические различия, возникающие в результате мутагенеза [13].

Целью данной работы было определить в условиях *in vitro* влияние исходной формы на генетическую изменчивость мутантных линий сои.

Материал и методы исследований. Исследования проводили в лаборатории сельскохозяйственной биотехнологии ФГБНУ «ФНЦ агроботехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайка».

Материалом для исследований послужили регенерантные линии сои, полученные от различных исходных форм методом культуры ткани с использованием, в качестве мутагенного фактора в питательной среде, ионов кадмия (Cd^{2+}) и меди (Cu^{2+}), ранее отобранные по комплексу хозяйственно ценных признаков.

Перевод пробирочных растений с нормально развитой корневой системой осуществляли в почвенный грунт (стерильный, ранее проавтоклавированный). Развитие растений R_0 протекало в условиях культуральной комнаты: освещенность 3,5-4,0 тыс. люкс, $t +25^\circ C$, фотопериод 16 часов.

Биохимический состав семян исходных форм и регенерантных линий изучали на базе ФГБНУ «ВНИИ сои» на ИК-сканере Nir-42 (ВНИИ сои, г. Благовещенск) [14].

Тотальную ДНК выделяли из фрагментов свежих листьев солевым методом [15]. ПЦР проводили в двух-трех повторностях, используя термоциклеры Mj Mini (Bio-Rad) и C-1000 Touch (Bio-Rad) в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мМ трис-HCl (pH 8,3); 50 мМ KCl; 0,001% желатина; 8,0 мМ $MgCl_2$; 0,250 мМ раствор каждого из дезоксирибонуклеозидфосфатов (dATP, dGTP, dTTP, dCTP); 0,2 – 0,4 мкмоль олигонуклеотидного праймера (табл. 2); 30-50 нг геномной ДНК и 0,2 ед. Taq-полимеразы. В реакции использовали следующий температурный режим (40 циклов): денатурация – 94° , 45 с; отжиг праймера – $48, 58^\circ C$, 45 с; синтез – 72° , 45 с. Контрольная проба содержала полную амплификационную смесь, но без добавления ДНК. Продукты амплификации

разделяли электрофорезом в 1,4 – 2% агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Визуализацию фрагментов ДНК осуществляли облучением УФ с помощью гель-документирующей системы Gel-Doc XR+ (Bio-Rad). Для определения длины фрагментов использовались маркеры молекулярных масс 100 bp DNA Ladder и 1 kb DNA Ladder. Для каждого праймера составлены бинарные матрицы, где присутствие или отсутствие фрагмента с одной молекулярной массой обозначается «1» или «0», соответственно. На основании бинарных матриц рассчитаны основные показатели генетической изменчивости. Статистическую обработку полученных данных проводили с применением пакетов программ POPGENE, TFPGA.

Результаты и обсуждение. По результатам биохимического анализа, регенерантные линии превысили показатели содержания в семенах масла, олеиновой и линолевой кислот, при этом снизив содержание линоленовой кислоты, которая влияет на качественный состав соевого масла (табл. 1).

Регенерантная линия R 1584 выделена как лучшая по некоторым, достоверно превышающим стандарт, признакам: масло – 7%, линолевая кислота – 1,6%, линоленовая – ниже на 16,7%.

Методом ISSR анализа проанализировано три регенерантные линии (R1568, R1577, R1584), полученные с использованием ионов кадмия и выделенные по комплексу хозяйственно ценных признаков и биохимическим показателям, а также их исходная форма – сорт сои Приморская 301 по 9 ISSR-праймерам (табл.2).

Таблица 1

Характеристика регенерантных линий сои, полученных на средах с ионами меди и кадмия по биохимическим показателям

Сорт, форма	Содержание в семенах белка, %	Содержание в семенах масла, %	Содержание гистидина, % от общего количества аминокислот	Содержание кислоты, % от общего количества масла в семенах		
				олеиновая кислота	линолевая кислота	линоленовая кислота
Приморская 81- стандарт	39,4	18,8	8,1	13,1	50,2	9,0
Приморская 301-исходная форма	38,6	18,7	7,2	13,0	50,1	8,9
R 1584 (и.ф. Приморская 301-5Cd ²⁺)	38,1	20,1*	7,4	14,7	51,0*	7,5*
R 1568 (и.ф. Приморская 301-10Cd ²⁺)	40,1	18,8	6,0	17,4*	50,1	9,2

Примечание: * – достоверно превосходит стандарт на 5% уровне

Таблица 2

Праймеры, используемые для выявления генетической изменчивости линий, полученных с использованием Cd²⁺

Код праймера	Нуклеотидная последовательность (5' → 3')	Число учитываемых фрагментов ДНК	
		всего	полиморфных
808	(AG) ₈ C	9	5
812	(GA) ₈ T	5	0
840	(GA) ₈ (CT)T	7	2
856	(AC) ₈ CTA	6	0
834	(AG) ₈ (CT)T	4	0
868	(GAA) ₆	6	2
S1	(CA) ₈ TG	2	0
S2	(ACA) ₅	8	0
S9	(CA) ₈ GT	5	0
C5	(TCG) ₆ G	6	1
Всего		54	10 (18,52%)

В результате ПЦР выявлено 54 фрагмента, 10 из которых оказались поли-

морфны, полиморфизм в объединённой выборке составил: P=18,52%. Размеры выявленных фрагментов варьировали от 300 до

3000 п.н., количество ампликонов продуцируемых праймерами составило от 2 до 9. Наибольшее количество полиморфных

фрагментов амплифицировано праймером 808 – 9, праймерами 840 и 868 по 2 фрагмента и С5 – 1 фрагмент (рис. 1).

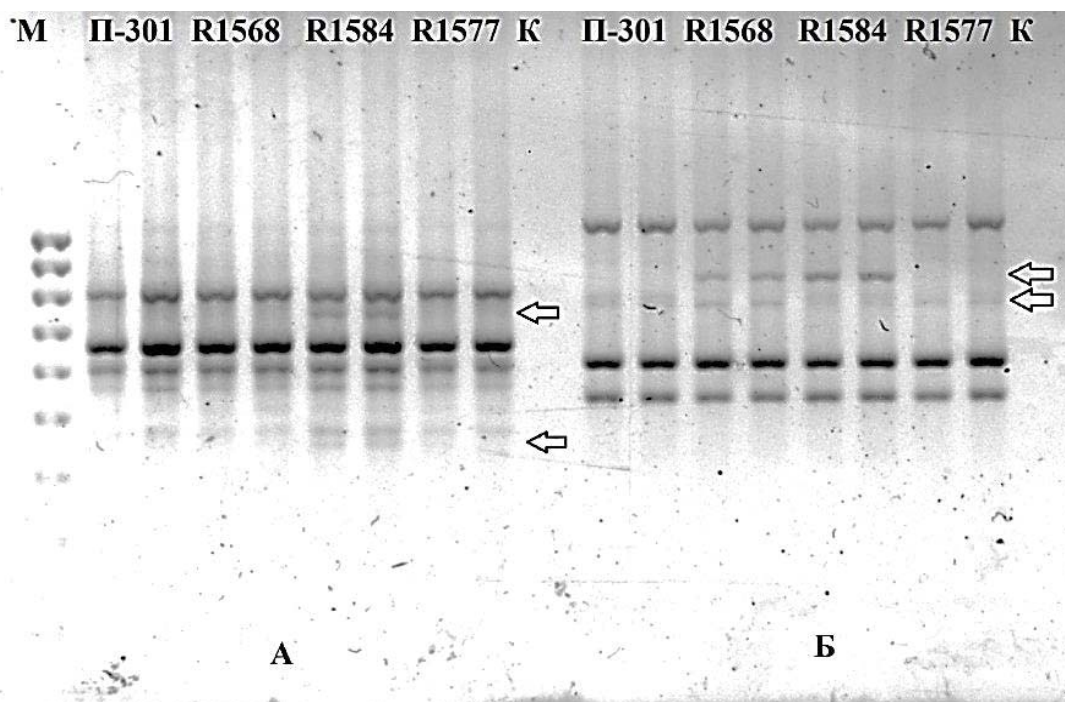


Рис.1. Электрофореграмма продуктов амплификации праймеров 840 (А) и 868 (Б). М – маркер молекулярных масс 100bp ladder, К – отрицательный контроль реакции. Стрелками показаны полиморфные фрагменты

Для оценки уровня генетических отличий на основе анализа бинарной матрицы были рассчитаны индексы генетических различий (D_N) исследуемых линий и их исходной формы – Приморская 301 (табл. 3).

Все исследуемые линии имеют генетические различия, как с исходной формой, так и друг с другом. Наибольшие дистанции выявлены между исходной формой и линией R1584, а также между парами линий R1568/R1584 и R1584/R1577. Наименьшее значение генетических различий выявлено

между линиями R1568 и R1577. Для визуализации обнаруженных генетических дистанций была построена дендрограмма методом невзвешенного попарно-группового анализа (UPGMA) (рис. 2). Топология филогенетического дерева отражает генетические отличия изученных сортообразцов, и демонстрирует наибольшие отличия линии R1584, которая образует собственный кластер с максимальной длиной ветви (длина ветвей отражает уровень генетических отличий).

Таблица 3

Генетические дистанции (D_N) 3 регенерантных линий сои, полученных с использованием Cd^{2+} и исходной формы – сорта Приморская 301 по 9 ISSR праймерам.

Сорт, линия.	П-301	R1568	R1584	R1577
П-301	***			
R1568	0.1178	***		
R1584	0.1388	0.1388	***	
R1577	0.0770	0.0377	0.1388	***

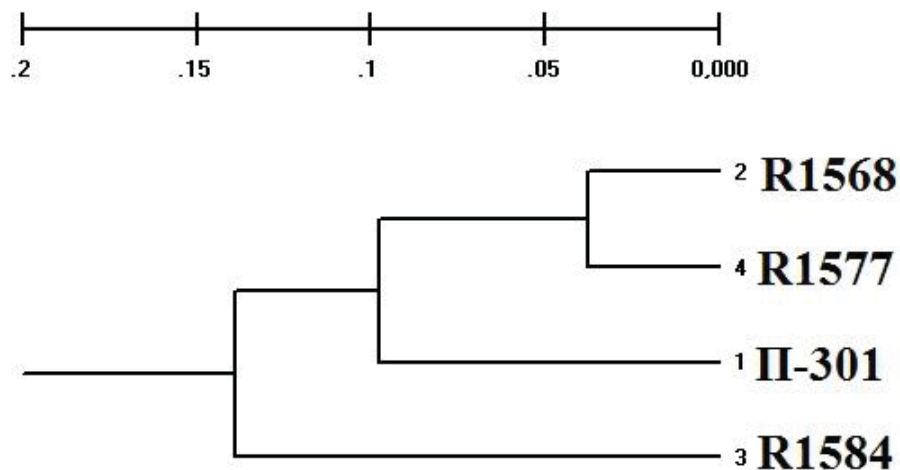


Рис.2. UPGMA дендрограмма филогенетических взаимоотношений соматклональных линий сои, полученных с использованием ионов кадмия и их исходной формы по девяти ISSR праймерам. Длина ветвей отражает уровень генетических отличий.

Одной из фундаментальных проблем является влияние различных факторов на генетическую изменчивость получаемых линий. Использование культуры *in vitro* приводит к появлению соматклональной изменчивости. Используемые в наших исследованиях ионы тяжелых металлов являются селективным для получения толерантных форм, а также мутагенным факторами [1-3]. Ранее нами были изучены регенерантные линии, полученные с использованием ионов меди и кадмия от исходных форм – сортов Ходсон и Приморская 301. Исходные формы по-разному отзывались на регенерацию [16,17].

В данных исследованиях мы получили разные картины распределения генетической изменчивости полученных линий в зависимости от используемого иона тяжелого металла. Линии, полученные от исходной формы сорта Ходсон на средах с содержанием Cd^{2+} демонстрировали больший полиморфизм и уровни максимальный уровень генетических дистанций ($P=24,6\%$, $D_N=0,3538$), чем регенеранты культивированные с добавлением Cu^{2+} ($P=16,98\%$, $D_N=0,1861$).

В результате исследования регенерантных линий, полученных с использованием

разных ионов тяжёлых металлов, мы выявили влияние генотипа исходной формы на генетическую изменчивость исследуемых образцов. Регенеранты сорта Приморская 301 демонстрировали меньшую изменчивость, чем линии, полученные от сорта Ходсон. Таким образом, генетическая изменчивость линий Приморской 301, полученных с использованием Cd^{2+} , значительно ниже, чем линий сорта Ходсон – полиморфизм $P=18,25\%$ против $24,6\%$, максимальные генетические различия $D_N=0,1388$ против $D_N=0,3538$. В результате исследования линий, полученных с помощью Cu^{2+} , не обнаружено генетических различий между линиями, выделившимися по комплексу биохимических и хозяйственно-ценных признаков исходной формы, которой является Приморская 301, в отличие от линии от и. ф. Ходсон.

На основании полученных данных прослеживается влияние на генетическую изменчивость исследуемых образцов, таких факторов, как природа используемого иона и генотип исходной формы. Исходя из того, что разные сорта не одинаково отзываются, но должны обладать желаемыми хозяйственно ценными признаками, выбор исходной формы оказывает наибольшее влияние на генетическую изменчивость полученных линий.

Список литературы

1. Генетический и структурный анализ устойчивости гороха посевного к токсичным концентрациям кадмия / В. Е. Цыганов [и др.] // Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века. XII съезд Русского ботанического общества: матер. всерос. конф. (Петрозаводск, 22–27 сент. 2008 г.). В 6 ч. Ч. 6. Экологическая физиология и биохимия растений. Интродукция растений. – Петрозаводск : Карельский научный центр РАН, 2008. – С. 140–142.
2. Способ определения мутагенного эффекта тяжелых металлов: Пат. 53375. Украина, МПК7 АО1G7//00/ Глухов О.З., Хижняк Н.А., Сафонов А. – № 2002053834; Заявл. 10.05.02. Оpubл. 15.01.03. Бюл. №1.
3. Сергеева, Л.Е. Ионы тяжелых металлов *in vitro*: новые идеологии для получения генетически измененных форм растений / Л.Е. Сергеева, Л.И. Бронникова // Вестник защиты растений. – 2016. – №3 (89). – С. 152-153.
4. Кошкин, Е.И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур / Е.И. Кошкин. – Москва: Дрофа, 2010. – 640 с.
5. Гладков, Е.А. Биотехнологические методы получения растений полевицы побегоносной *Agrostis stolonifera*, обладающих устойчивостью к кадмию и свинцу / Е.А. Гладков // Сельскохозяйственная биология. – 2008. – № 3. – С. 83-87.
6. Коротченко, И.С. Влияние тяжелых металлов на содержание фотосинтетических пигментов в листьях моркови / И.С. Коротченко // Вестник КрасГАУ. – 2011. – № 4. – С. 86-91.
7. Белимов, А.А. Микробиологические аспекты устойчивости и аккумуляции тяжелых металлов у растений / А.А. Белимов, И.А. Тихонович // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – № 3. – С. 10-15.
8. Кулаева, О.А. Молекулярно-генетические основы устойчивости высших растений к кадмию и его аккумуляции / О.А. Кулаева, В.Е. Цыганов // Экологическая генетика. – 2010. – Т. VIII, № 3. – С. 3-15.
9. Воронина, Л.П. Влияние Zn и Cd на поступление питательных элементов в ячмень / Л.П. Воронина, Е.В. Морачевская, К.В. Павлов // Экологическая агрохимия / под ред. В.Г. Минеева; МГУ. – Москва, 2008. – С. 83-91.
10. Глазко, В.И. Генетические взаимоотношения между сортами сои с использованием ISSR маркеров / В.И. Глазко, А.В. Дубинин, Р.Н. Календарь [и др.] // Цитология и генетика. – 1999. – Т. 31, № 10. – С. 1358-1364.
11. Международный классификатор СЭВ рода *Glycine Weld* / [сост. СССР – Л. Щелко, Г. Седова, В. Корнейчук; ЧСФР – Л. Пастухова, Г. Синский, П. Гофирек и др.]; ВАСХНИЛ, ВИР. – Ленинград., 1990. – 46 с.
12. Ефремова, О.С. Влияние ионного стресса на уровень генетической изменчивости регенерантов сои / Ефремова О.С., П.В. Фисенко // Дальневосточный аграрный вестник. – 2016. - № 4 (40). – С.30-37.
13. Ефремова, О.С. Влияние мутагенного действия ионов меди на уровень генетической изменчивости регенерантов сои / Ефремова О.С., Фисенко П.В. // Дальневосточный аграрный вестник. – 2017. - № 4 (44). – С.30-37.
14. Roy B. Towards development of Al-toxicity tolerant lines in indica rice by exploiting somaclonal variation / B. Roy, A. B. Mandal // Euphytica. – 2005. – V. 145. – P. 221–227.
15. Mahmood I. In vitro selection of tissue culture induced somaclonal variants of wheat for drought tolerance / I. Mahmood, A. Razzaq, M. Ashraf, I. A. Hafiz, S. Kaleem, A. Qayyum, M. Ahmad // Journal of Agricultural Research. - 2012. – V. 50. – Is. 2 – P. 177-188.
16. Effect of cadmium on nodulation and N₂-fixation of soybean in contaminated soils / Y.X. Chen, Y.F. He, Y. Yang [et al.] // Chemosphere. – 2003. – Vol. 50. – P. 781-787.
17. Salah, M. Aljanabi and Iciar Martinez. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucleic Acids Research, 1997, Vol. 25, No. 22, P. 4692-4693.

Reference

1. Geneticheskij i strukturnyj analiz ustojchivosti goroha posevnogo k toksichnym koncentracijam kadmiya (Genetic and Structural Analysis of Resistance of Peas to Toxic Concentrations of Cadmium), V. E. Cyganov [i dr.], Fundamental'nye i prikladnye problemy botaniki v nachale XXI veka. XII s'ezd Russkogo botanicheskogo obshchestva: mater. vseros. konf. (Petrozavodsk, 22–27 sent. 2008 g.). V 6 ch. CH. 6. Ekologicheskaya fiziologiya i biokhimiya rastenij. Introdukciya rastenij, Petrozavodsk, Karel'skij nauchnyj centr RAN, 2008, PP. 140–142.
2. Sposob opredeleniya mutagenogo ehffekta tyazhelyh metallov (Method for Determining the Mutagenic Effect of Heavy Metals), Pat. 53375, Ukraina, MPK7 AO1G7//00/, Gluhov O.Z., Hizhnyak N.A., Safonov A., No 2002053834, Zayavl. 10.05.02., Opubl. 15.01.03., Byul. No 1.
3. Sergeeva, L.E., Bronnikova, L.I. Iony tyazhelyh metallov in vitro: novye ideologii dlya polucheniya geneticheski izmenennyh form rastenij (Heavy Metal Ions in Vitro: New Ideologies for Obtaining Genetically Modified Plant Forms), *Vestnik zashchity rastenij*, 2016, No (89), PP. 152-153.

4. Koshkin, E.I. Fiziologiya ustojchivosti sel'skohozyajstvennyh kul'tur (Physiology of Crop Sustainability), Moskva, Drofa, 2010, 640 p.
5. Gladkov, E.A. Biotekhnologicheskie metody polucheniya rastenij polevicy pobegonosnoj Agrostis stolonifera, obladayushchih ustojchivost'yu k kadmiju i svincu (Biotechnological Methods of Obtaining the Plants of the Metropolitan Bent Agrostis stolonifera with Resistance to Cadmium and Lead), *Sel'skohozyajstvennaya biologiya*, 2008, No 3, PP. 83-87.
6. Korotchenko, I.S. Vliyanie tyazhelyh metallov na sodержanie foto-sinteticheskikh pigmentov v list'yah morkovi (Influence of Heavy Metals on the Content of Photosynthetic Pigments in Carrot Leaves), *Vestnik KrasGAU*, 2011, No 4, PP. 86-91.
7. Belimov, A.A., Tihonovich, I.A. Mikrobiologicheskie aspekty ustojchivosti i akumulyatsii tyazhelyh metallov u rastenij (Microbiological Aspects of Resistance and Accumulation of Heavy Metals in Plants), *Sel'skohozyajstvennaya biologiya*, 2011, No 3, PP. 10-15.
8. Kulaeva, O.A. Cyganov, V.E. Molekulyarno-geneticheskie osnovy ustojchivosti vysshih rastenij k kadmiju i ego akumulyatsii (The Molecular and Genetic Bases of Resistance of Higher Plants to Cadmium and its Accumulation), *Ehkologicheskaya genetika*, 2010, T. VIII, No 3, PP. 3-15.
9. Voronina, L.P., Morachevskaya, E.V., Pavlov, K.V. Vliyanie Zn i Cd na postuplenie pitatel'nyh elementov v yachmen' (Effect of Zn and Cd on Nutrient Intake in Barley), *Ehkoloicheskaya agrohimiya*, pod red. V.G. Mineeva, MGU, Moskva, 2008, PP. 83-91.
10. Glazko, V.I. Geneticheskie vzaimootnosheniya mezhdu sortami soi s ispol'zovaniem ISSR markerov (Genetic Relationships Between Soybean Varieties Using ISSR Markers), V.I. Glazko, A.V. Dubinin, R.N. Kalendar' [i dr.], *Citologiya i genetika*, 1999, T. 31, No 10, PP. 1358-1364.
11. Mezhdunarodnyj klassifikator SEHV roda Glycine Weld (International Classifier of CMEA of the Genus Glycine Weld), [sost. SSSR – L. Shchelko, G. Sedova. V. Kornejchuk, CHSFR – L. Pastuhova, G. Sinskij, P. Gofirek i dr.], VASKHNIL, VIR, Leningrad, 1990, 46 p.
12. Efremova, O.S., Fisenko, P.V. Vliyanie ionnogo stressa na uroven' geneticheskoy izmenchivosti regenerantov soi (Influence of Ion Stress on the Level of Genetic Variability of Soybean Regenerants), *Dal'nevostochnyj agrarnyj vestnik*, 2016, № 4 (40), PP.30-37.
13. Efremova, O.S., Fisenko, P.V. Vliyanie mutagennogo dejstviya ionov medi na uroven' geneticheskoy izmenchivosti regenerantov soi (The Influence of the Mutagenic Effect of Copper Ions on the Level of Genetic Variation of Soybean Regenerants), *Dal'nevostochnyj agrarnyj vestnik*, 2017, No 4 (44), PP. 30-37.
14. Roy, B. Towards development of Al-toxicity tolerant lines in indica rice by exploiting somaclonal variation, B. Roy, A. B. Mandal, *Euphytica*, 2005, V. 145, PP. 221–227.
15. Mahmood, I. In vitro selection of tissue culture induced somaclonal variants of wheat for drought tolerance, I. Mahmood, A. Razzaq, M. Ashraf, I. A. Hafiz, S. Kaleem, A. Qayyum, M. Ahmad, *Journal of Agricultural Research.*, 2012, V. 50, Is. 2. PP. 177-188.
16. Effect of cadmium on nodulation and N₂-fixation of soybean in contaminated soils, Y.X. Chen, Y.F. He, Y. Yang [et al.], *Chemo-sphere*, 2003, Vol. 50, PP. 781-787.
17. Salah, M. Aljanabi and Iciar Martinez. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques, *Nucleic Acids Research*, 1997, Vol. 25, No. 22, PP. 4692-4693.