

Жамбакин К.Ж.,  
Волков Д.В., Затыбеков А.К.,  
Шамекова М.Х.

**Использование  
индуцированного химического  
мутагенеза для получения  
растений  
с заданными свойствами**

Zhambakin K.Zh.,  
Volkov D.V., Zatybekov A.K.,  
Shamekova M.Kh.

**Using induced chemical  
mutagenesis to the production of  
plants with specified properties**

Жамбакин К.Ж.,  
Волков Д.В., Затыбеков А.К.,  
Шамекова М.Х.

**Қалаған белгілері бар  
өсімдіктерді алу үшін  
индукцияланған химиялық  
мутагенезді қолдану**

В обзоре обсуждаются перспективы использования химического мутагенеза для получения сельскохозяйственных культур с заданными свойствами. Развитие эффективных биотехнологий на основе мутагенеза для использования в селекции получения новых сортов крайне актуально для Казахстана, как зоны рискованного земледелия. В статье приводятся примеры, когда традиционное использование мутантных линий в селекционном процессе, в том числе, включение их в гибридизацию обладает высоким потенциалом в создании сортов. В тоже время, повысить эффективность индуцированного мутагенеза в селекции можно с помощью использования культуры клеток и тканей. В культуре *in vitro* наиболее перспективно использовать изолированные микроспоры. Применение химических мутагенов открывают новые перспективы в фундаментальных исследованиях по изучению функции генов растений.

**Ключевые слова:** мутагенез, селекция, сельскохозяйственные культуры, этилметан сульфонат, культура клеток и тканей, пшеница, рапс.

The review discusses the prospects for the use of chemical mutagenesis to produce crops with valuable traits. The development of effective biotechnology-based mutagenesis for use in breeding new cultivars of produce is very important for Kazakhstan as a zone of risky agriculture. The article gives examples where the traditional use of mutant strains in the selection process, including their incorporation into hybridization has great potential in creating cultivars. At the same time, to increase the effectiveness of induced mutagenesis in selection can be by the use of cell culture and tissue. The *in vitro* culture is the most promising use of isolated microspores. The use of chemical mutagens open new perspectives in basic research on the study of the functions of plant genes.

**Key words:** mutagenesis, selection, crops, etilmetan sulfonate, cell and tissue culture, wheat, canola.

Қазіргі таңда химиялық мутагенезді құнды белгілері бар ауыл шаруашылық дақылдарды алу үшін қолдану мәселесі талқыланады. Селекцияда жаңа сорттарды шығару үшін тиімді биотехнологиялық мутагенез негізін дамыту, тәуекелді ауыл шаруашылығы аймағы ретінде, Қазақстан үшін өте маңызды болып табылады. Дәстүрлі селекцияда мутантты линияларды қолдана ала, оның ішінде гибридизацияға қосу, жаңа сорттарды шығару үшін үлкен әлеуетті бар мысалдар бұл мақалада беріледі. Сол уақытта клетка және ұлпа дақылдарын пайдалана отырып селекцияда индукцияланған мутагенезді жетілдіреді. *in vitro* дақылында жекеленген микроспораларды қолдану ұтымды. Өсімдік генінің функциясын зерттеу үшін, химиялық мутагендерді пайдалану, жаңа келешекте фундаментальдық зерттеулерді ашады.

**Түйін сөздер:** мутагенез, селекция, аулшаруашылық дақылдар, этильметансульфонат, клетка және ұлпа дақылдары, бидай, рапс.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ  
ИНДУЦИРОВАННОГО  
ХИМИЧЕСКОГО  
МУТАГЕНЕЗА  
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ  
РАСТЕНИЙ  
С ЗАДАНЫМИ  
СВОЙСТВАМИ**

**Введение**

Продовольственная безопасность страны определяется высоким уровнем развития агропромышленного комплекса. Эффективность развития сельскохозяйственного производства в Казахстане во многом зависит от сортового ассортимента сельскохозяйственных культур. Поскольку практически все ареалы выращивания растений Казахстана относятся к зоне рискованного земледелия, возделываемые культуры должны быть устойчивыми к абиотическим и биотическим стрессовым факторам среды. Кроме того, сорта должны отвечать изменяющимся условиям возделывания. В связи с этим в селекции создания новых сортов должны использоваться методы, отвечающие сложившимся современным требованиям. Одним из эффективных способов получения новых сортов является индуцированный мутагенез. С его помощью созданы и широко возделываются во всем мире сорта пшеницы, ячменя, кукурузы, рапса и других сельскохозяйственных культур. При этом на современном этапе, мутагенез используется не только в сочетании с традиционными методами отбора и гибридизации, но и с использованием методов культивирования на искусственной питательной среде и методов молекулярной биологии.

Цель работы являлось определить на основе анализа литературы перспективность различных способов химического мутагенеза для получения растений с заданными свойствами. Выявить наилучшие, на современном этапе, мутагены для использования в прикладных и фундаментальных селекционных исследованиях.

**Использование мутагенеза в традиционной селекции**

Основным преимуществом мутагенеза является создание различных вариаций используемых генотипов, из которых можно вести отбор по искомым признакам. Имея широкое разнообразие, в некоторых случаях возможно прогнозирование в мутационном спектре тех или иных нужных наследственных изменений, такой прогноз ускоряет селекционный процесс и создание новых сортов [1].

Сорта, полученные на основе мутагенеза, наиболее распространены среди зерновых, чем среди бобовых и масличных культур. Среди зерновых, методы мутагенеза были наиболее успешно использованы для риса, ячменя, пшеницы и кукурузы [2]. Известно, что мутагенез перспективен для создания пшеницы с широким спектром изменчивости. При этом, используется как химические, так и физические мутагены. В частности с использованием гамма лучей получены засухоустойчивые линии пшеницы для условий выращивания в Кении [3].

Отмечается, что сочетание при гибридизации химических мутантов и сортов озимой твердой пшеницы различного эколого-географического происхождения обусловило высокую селекционную ценность сложных гибридных популяций, определяющую эффективность отбора высокопродуктивных генотипов с высокими адаптивными свойствами и качеством зерна [4]. Исследования по яровой твердой пшенице также выявили перспективность использования химического мутагенеза. Были созданы новые ее сорта с более коротким вегетационным периодом в сравнении с традиционными сортами, сокращенном на 15-20 дней (сорта Новодонская, Вольнодонская, Донская элегия и др.) [5].

Константный пшенично-пырейный гибрид был обработан низкими концентрациями этилена (0,01 – 0,04%) при замачивании в растворе воздушно-сухих семян, при экспозиции 24 часа. Растения, несущие мутации, выделяли во втором и в третьем поколениях. Были обнаружены мутанты, одновременно устойчивые к пыльной и твердой головне. Это были мутанты с маркерными признаками, указывающими на устойчивость и на степень устойчивости. Например, мутанты с интенсивно сизым колосом оказались устойчивыми к твердой головне. Мутанты с опушенным колосом – устойчивы к пыльной и твердой головне [6].

Показано, что как экспериментальный мутагенез, так и гибридно-мутационные скрещивания – перспективные направления селекции для решения проблемы создания высокопродуктивных сортов яровой пшеницы с высоким качеством зерна. Применение мутагена 1,4-бисдиазоацетилбутана на яровой твердой пшенице в условиях степной зоны Ростовской области позволило создать ряд конкурентоспособных, высококачественных линий и сортов [7]. В Актюбинской СХОС для расширения генетического разнообразия пшеницы применяется индуцированный химический мутагенез

(нитрозометилмочевина, нитрозодиметилмочевина и др.), наряду с внутри- и межвидовой гибридизацией. Использование мутагенов в условиях Западного Казахстана позволило создать целый ряд конкурентоспособных, высококачественных линий и сортов. Лучший из них – сорт селекции АСХОС Каргала 69 [8].

Из химических мутагенов широкую популярность приобрел этилметансульфонат (ЭМС) [9]. Особенностью данного мутагена является его способность производить точечные мутации, которые приводят к замене азотистых оснований в нуклеиновых кислотах, которые в дальнейшем приводят к изменению, но не прекращению функции соответствующих белков. В тоже время, эти мутации могут вызвать широкие изменения различных признаков и параметров растений [10]. Более того, данный мутаген может быть использован как непосредственно на семенной материал, так и в культуре *in vitro* [11]. При этом его эффективность в значительной степени была продемонстрирована на зерновых культурах, в том числе и на пшенице [12]. Так с использованием данного мутагена выделены мутанты с измененными технологическими качествами пшеницы [13], мутанты устойчивые к грибковым заболеваниям [14, 15]. При обработке семян пшеницы мутагеном ЭМС определена высокая наследуемость индуцированной изменчивости в поколениях M2 и M3. Отмечено, что посредством обработки ЭМС возможно увеличение признаков урожайности твердой пшеницы в M3 поколении. При этом в генерации M3 было выделено наибольшее количество линий с улучшенными признаками, чем в M2. В дальнейших самоопыленных поколениях признаки с высокими признаками урожайности сохранялись. Авторами подчеркивается высокая перспективность использования мутагена в селекции на увеличение показателей продуктивности пшеницы твердых сортов [16].

Одной из современных методов агротехнологий, показавшей высокий эффект как по продуктивности, так и защите от почвенной эрозии, является нулевая технология возделывания почвы (*no-till technology*), которая подразумевает обязательное использование гербицидов сплошного действия. Министерство сельского хозяйства Республики Казахстан, ввиду очевидной выгоды нулевой технологии поддерживает фермерские хозяйства, внедряющие ее на своих полях [17]. Наиболее эффективно для нулевых технологий использование сортов сельскохозяйственных культур, устойчивых к гербицидам сп-

лошного действия. Однако, большинство из сортов, устойчивых к таким гербицидам, являются генетически модифицированными. Негативное отношение к генетически модифицированным растениям особенно остро, если данные культуры используются в пищу. В связи с этим, создание устойчивых к гербицидам сплошного действия сортов, в том числе и пшеницы, проводится с использованием мутагенеза [18]. Наиболее широко в мире, в том, числе и в Казахстане, используется глифосат содержащие гербициды «раундап» и «ураган». В настоящее время уже созданы мутанты пшеницы устойчивые к гербицидам, содержащим активное вещество – глифосат [19]. Кроме того, получены мутанты пшеницы устойчивые к гербицидам сплошного действия с активным действующим веществом имидазолинон [20]. В Индии используются мутантные и генетически модифицированные линии риса устойчивые к трем классам гербицидов сплошного действия с действующими веществами: имидазолинон, глифосат и глюфозинат. При этом, отмечается высокая экономическая выгода выращивания таких сортов при нулевой технологии в пшенично – рисовом севообороте [21].

Как показывает анализ вышеприведенных данных, отбор растений с искомыми признаками можно начинать уже в M2 поколении, при этом сочетание мутагенеза с гибридизацией показало свою высокую эффективность.

### Химические мутагены в культуре *in vitro*

Основным приемом получения мутантов зерновых культур является воздействие мутагена на семенной материал, с последующим отбором выживших растений при селективном факторе. Данный метод является трудоемким, требует большого количества времени, наблюдается низкий процент реальных мутантов среди выживших на селективной среде растений.

Альтернативным путем получения мутантов является использование культуры клеток *in vitro*. В этом случае можно создавать условия непосредственного воздействия мутагеном на сотни и тысячи клеток. Перспективность мутагенеза в культуре клеток и тканей растений доказана многочисленными работами на разных культурах. Для получения культуры клеток используются различные растительные экспланты. В частности в экспериментах с фасолью обыкновенной (*Phaseolus vulgaris L.*), для получения каллусных культур использовались листовые черешки. На каллусные клетки воздейст-

ли мутагенами нитрозоэтил мочевиной и ЭМС. В результате работы определены оптимальная концентрация и время обработки мутагенами культуры каллусных клеток [22]. Мутагенез в культуре *in vitro* происходит с большей частотой и в некоторых случаях возможен предварительный скрининг на мутации определенных генов [23]. Проведена попытка получения мутантов винограда устойчивых к серой гнили в культуре соматических эмбриоидов в присутствии ЭМС [24]. Отмечается высокая эффективность индукции мутантов при сочетании клонального размножения с использованием пазушных почек и присутствия химических мутагенов. В особенности данный подход удобен для вегетативно размножающихся культур [25]. Показана возможность мутагенного воздействия раствором азида натрия на каллусную культуру изолированных пыльников и незрелых зародышей пшеницы, с последующим проведением предварительного отбора на засухоустойчивость в культуре *in vitro* с использованием полиэтиленгликоля [26], подобная же работа была проведена и на уровне соматических каллусов банана [27]. Вместе с тем, прямое воздействие на суспензию изолированных соматических клеток химическими мутагенами приводит к более широкому разнообразию мутантного материала, при этом полученное разнообразие наиболее удобно фиксировать с использованием ДНК маркеров [28].

В тоже время, по сравнению с культурой соматических клеток, культура изолированных микроспор является более эффективной системой получения мутантных линий сельскохозяйственных культур. Преимуществами мутагенеза гаплоидных клеток является: (1) возможность избежать химеризм; (2) мутанты могут быть быстро обнаружены, (3) выявление рецессивных мутантов возможно уже в первом поколении; (4) цикл получения гомозиготных мутантов сокращается. Кроме того, наличие большого количества микроспор увеличивает вероятность выявления лучших мутантов, в частности возможен отбор уже на уровне культивирования *in vitro* [2, 29, 30].

Показано, что сочетание мутагенеза с гаплоидной биотехнологией позволяет ускорить процесс быстрого получения гомозиготных, нерасщепляющихся линий пшеницы из гибридного и мутагенного материала [31].

В присутствии гербицида регенерация растений из андрогенных эмбрионов проходит с большой частотой. Таким образом, отселектированные к гербициду гомозиготные растения бы-

ли быстро получены путем удвоения хромосом [32]. Удачное использование мутагенов в культуре изолированных пыльников и микроспор было показано на ячмене [2].

Однако использование культуры изолированных микроспор для пшеницы до сих пор является проблематичным, прежде всего из-за высокой зависимости эмбриогенеза и регенерации растения от генотипа, а также высокого процента альбинизма регенерантов. В связи с этим, необходимо подбирать условия культивирования и составы питательных сред непосредственно под исследуемый растительный материал с учетом их генетических особенностей.

Использование химического мутагенеза широко практикуется у семейства *Brassica* в культуре изолированных микроспор. При этом используются различные концентрации при разной продолжительности обработки. Показана, не только высокая эффективность химического мутагенеза при культивировании изолированных микроспор рапса, но и возможность отбора высокоурожайных [33] и высококачественных дигаплоидных линий [34].

Следует отметить большое разнообразие целевых признаков в селекции рапса, при использовании мутагена ЭМС в культуре изолированных микроспор. Показано получение мутантных удвоенных гаплоидов рапса, устойчивых к заболеваниям, вызываемым грибом *Sclerotinia sclerotiorum* [35].

Так, известно, обработка ЭМС в процессе культивирования изолированных микроспор существенно влияет на компонентный состав масла, при этом может измениться количество олеиновой, линолевой, пальметиновой и эруковой кислот [34, 36].

Мутагенез в культуре *in vitro* имеет хорошие перспективы развития. Поскольку в культуре клеток и тканей можно создавать любые модели стрессов и уже на этом уровне проводить предварительный отбор устойчивых клеток, с последующей регенерацией растений. В этом плане, наилучшие перспективы имеют культуры, у которых возможно получение удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор. При этом, используются настолько малые концентрации мутагенов, что их канцерогенное воздействие на оператора минимально.

Кроме того, интересно использовать мутагенез *in vitro* на культурах, размножаемых вегетативно. В частности, культура клеток позволяет наряду с получением высокого разнообразия генотипов по морфологическим признакам, кло-

нировать их достаточно быстро. Данное направление должно быть перспективно для декоративных культур.

### Использование ЭМС в фундаментальных исследованиях

Поскольку этилметансульфонат, как известно, вызывает в основном точечные мутации в виде перехода G / C к A / T [37], мутации в локусах позволяют изучать функции отдельных генов. Подобные исследования – первые шаги к пониманию функции генов на молекулярном уровне [38, 39].

Для эффективного изучения функционального значения отдельных генов растений необходима высокая частота мутаций, эффективный метод скрининга, и выбор признаков с высокой наследуемостью. Идеальной мишенью в этом смысле оказались гены *Puroindoline a* и *b* (*Pin a* и *Pin b*, соответственно), которые вместе составляют *Ha* локус пшеницы. Данный локус контролирует пористость зерна и соответственно влияет на другие технологические параметры зерна. Точечные мутации были созданы с помощью ЭМС. На основании проведенных экспериментов показано, что ген *Pin b* имеет более решающее значение для общей функции локуса *Ha* [40]. С использованием ЭМС были получены мутанты пшеницы с пониженным содержанием фитиновой кислоты и увеличением концентрации неорганического P в отрубей почти в четыре раза. Данные наследования в F2 и F4 6 семей не согласуются с мутацией одного гена и предполагает мутацию двух или более генов [41]. Кроме того выделены индуцируемые ЭМС мутанты пшеницы с различным уровнем отмирания листьев. Такие мутанты интересны точки зрения изучения эффективности фотосинтеза в повышении урожайности пшеницы [42].

Сообщается о формировании карты на основе клонирования гена Yr36 (WKS1), который придает устойчивость к широкому спектру рас желтой ржавчины при относительно высоких температурах (от 25° до 35°C). Мутации выявили структуру гена и показали, что изучаемый ген играет значимую роль в устойчивости к желтой ржавчине пшеницы. Ген Yr36 присутствует в диких сородичах пшеницы, но отсутствует у современных сортов пшеницы, и поэтому в настоящее время могут быть использованы для повышения устойчивости к желтой ржавчине у широкого набора сортов [43].

Мутантные популяции, полученные на фоне ЭМС, использовались для изучения функциональной геномики рапса. Генетический скрининг мутантов популяции М2 по гену *FAEI*, который контролирует синтез эруковой кислоты в семенах рапса, выявил, что есть две копии *FAEI*, по одному на каждый из А и С геномов рапса [44].

Для изучения генетического разнообразия полученных мутантных растений используются ДНК-маркеры. Каждый молекулярный маркер имеет свои преимущества и недостатки, чувствительность обнаружения мутантных растений имеет свои особенности. Так при мутагенезе нарцисса, выявлено, что частота мутаций была 8,33% с использованием RAPD маркера и 15,48% на уровне AFLP маркера [45]. В других исследованиях 330 мутантных линий лилий, протестированные одновременно с использованием ISSR и RAPD маркеров. При этом, исполь-

зуя ISSR маркеры выявлены 119 мутантных на уровне ДНК линии, но не обнаружили мутагенеза используя RAPD маркеры. Наследственная изменчивость различных мутантов лилии, выделенных по морфологическим признакам достигала 36,06%, при использовании семи ISSR праймеров [46].

Перспективы развития мутагенеза в создании новых высокопродуктивных и устойчивых к стрессовым факторам сортов возрастают еще и потому, что данное направление является альтернативной генетической инженерии, против которой выступает значительная часть общественности в мире. Получение линий с точечной мутацией, в сочетании с методами молекулярной генетики позволит дать больше информации о механизме действия генов, что, в конечном счете, будет содействовать повышению эффективности селекционного процесса по получению новых сортов.

#### Литература

- 1 Эйгес Н.С. Историческая роль Иосифа Абрамовича Рапопорта в генетике. продолжение исследований с использованием метода химического мутагенеза // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – №17 (1). – С. 162 – 172.
- 2 Castillo A.M., Cistue L., Valles M.P., Sanz J.M., Romagosa I., Molina-Cano J.L. Efficient production of androgenic doubled-haploid mutants in barley by the application of sodium azide to anther and microspore cultures // Plant Cell Reports. – 2001. – Vol. 20. – P.105-111.
- 3 Njau P.N., Kinyua M.G., Kimurto P.K., Okwaro H.K., Maluszynski M. Drought tolerant wheat varieties developed through mutation breeding technique // Journal of Agriculture, Science and Technology. – 2005. – Vol. 7(1). – P.18-29.
- 4 Войсковой А. И., Кривенко А. А., Балацкий М. Ю. Использование химического мутагенеза и гибридизации в селекции озимой твердой пшеницы // «Вестник АПК Ставрополя». – 2011. – № 2(2). – С. 3-7.
- 5 Грабовец А.И., Фоменко М.А. Создание и внедрение сортов пшеницы и тритикале с широкой экологической адаптацией // Научно-производственный журнал «Зернобобовые и крупяные культуры». – 2013. – №2(6). – С.41-47.
- 6 Эйгес Н.С., Волченко Г.А., Волченко С.Г. Устойчивость к фитопатогенам полученная с использованием метода химического мутагенеза на озимой пшенице // Сборник научных трудов Уманского НУС. – Умань, 2013. – Вып. 83. – С.135-145.
- 7 Кадушкина В.П., Грабовец А.И., Бондарь Р.И. Использование химического мутагенеза в селекции яровой твердой пшеницы в степной зоне ростовской области // Журнал Известия оренбургского государственного аграрного университета. – 2013. – № 4 (42). – С. 62-65.
- 8 Цыганков В.И. Использование индуцированного мутагенеза при создании сортов и линий яровой твердой пшеницы для сухостепных условий Казахстана // Журнал Известия оренбургского государственного аграрного университета. – 2012. – № 3 (35). – С. 45-49.
- 9 Henikoff S., Comai L. Single-nucleotide mutations for plant functional genomics // Annu Rev Plant Biol. – 2003. – Vol.54. – P.375-401.
- 10 Salim Khan, Fahad Al-Qurainy, Firoz Anwar. Sodium Azide: a Chemical Mutagen for Enhancement of Agronomic Traits of Crop Plants // Environment and We an International Journal of Science and Technology. – 2009. – Vol.4. – P. 1-21.
- 11 Kim Y., Schumaker K.S., Zhu J.K. EMS mutagenesis of Arabidopsis, in Methods in molecular biology / Salinas J., Sanchez J.J. Arabidopsis protocols, (Human Press Inc. Totowa, NJ). – 2003. – Vol. 323, 2<sup>nd</sup>edn.
- 12 Bozzini A., Mugnozza G.T.S. Relative frequency of chlorophyll to morphological and sterility mutations induced in durum wheat by radiations and chemicals // Mutat. Res. – 2003. – Vol.9. – P. 589–597.
- 13 Debbie Laudencia-Chinguanco. Isolation and characterization of EMS-induced Dy10 and Ax1 high molecular weight glutenin subunit deficient mutant lines of elite hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Summit // Journal of Cereal Science. – 2012. – Vol.56. – P. 296-299.
- 14 Williams N. D., Miller J. D., Klindworth D. L. Induced Mutations of a Genetic Suppressor of Resistance to Wheat Stem Rust // Crop Sci. – 1992. – Vol.32. – P.612-616.

- 15 Kamlofski C. A., Antonelli E., Bender C., Jaskelioff M., Danna C. H., Ugalde R., Acevedo A. A lesion-mimic mutant of wheat with enhanced resistance to leaf rust // *Plant Pathology*. – 2007. – Vol. 56. – P. 46–54.
- 16 Sakin M.A., Yildirim A. Induced mutations for yield and its components in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) // *Food, Agriculture & Environment*. – 2004. Vol. 2 (1). – P.285-290.
- 17 <http://alau.kz/news/233/29225>
- 18 Dale L. Shaner, Newell F. Bascomb, Wendy Smith. Imidazolinone-resistant crops: selection, characterization, and management // *Herbicide – resistant crop* by CRC Press, ed. Stephen O. Duke. – 1996.
- 19 Kimberlee Kae Kidwell, Camille Marie Steber, Victor Louis Demacon, Gary Bruce Shelton, Daniel John Guerra, Adrienne Bryan Burke. Glyphosate-Tolerant Wheat Genotypes // patent US 20090320151. – 2007.
- 20 Keith E. Newhouse, Wendy A. Smith, Mark A. Starrett, Thomas J. Schaefer, Bijay K. Singh. Tolerance to Imidazolinone Herbicides in Wheat // *Plant Physiol*. – 1992. – Vol. 100. – P. 882-886.
- 21 Kumar V., Bellinder R.R., Gupta R.K., Malik R.K., Brainard D.C. Role of herbicide-resistant rice in promoting resource conservation technologies in rice–wheat cropping systems of India: A review // *Crop Protection*. – 2008. – Vol. 27. – P. 290-301.
- 22 Svetleva D.L., Crino P. Effect of ethyl methanesulfonate (EMS) and n-nitroso-n'-ethyl urea (ENU) on callus growth of common bean // *Journal of Central European Agriculture*. – 2005. – Vol.6. No 1. – P. 59-64.
- 23 Serrat Xavier, Esteban Roger, Guibourt Nathalie, Moysset Luisa, Nogués Salvador, Lalanne Eric. EMS mutagenesis in mature seed-derived rice calli as a new method for rapidly obtaining TILLING mutant populations // *Plant Methods*. – 2014. – V.10 Issue 1. – P.1.
- 24 Pathirana R. Production of improved Botrytis-tolerant Sauvignon Blanc clones combining in vitro and mutagenic technology // *Plant & Food Research, Final Report Template*, Palmerston North. – 2009.
- 25 Marcelina Krupa-Malkiewicz. Influence of chemical mutagens on morphological traits in kalanchoe (*KalanchoeHybrida*) Folia Pomer // *Univ. Technol. Stetin. Agric., Aliment.,Pisc., Zootech*. – 2010. – Vol. 279 (15). – P.11–18
- 26 Wang Jin, Liu Guiru, Yang Xueju. Callus mutation with EMS and drought-resistant mutants selection for wheat Chinese Agricultural Science Bulletin // *ZhongguoNongxue Tong Bao, Bianjibu*. – 2005. – Vol. 21(12). – P.190-193.
- 27 Siamak Shirani Bidabadi, Sariah Meon, Zakaria Wahab, Sreeramanan Subramaniam, Maziah Mahmood. *In vitro* selection and characterization of water stress tolerant lines among ethyl methanesulphonate (EMS) induced variants of banana (*Musa* spp., with AAA genome) // *Australian Journal of Crop Science*. – 2012. – Vol.6 (3). – P. 567-575.
- 28 Hofmann N.E., Raja R., Nelson R.L., Korban S.S. Mutagenesis of embryogenic cultures of soybean and detecting polymorphisms using RAPD markers // *BiologiaPlantarum*. – 2004. – Vol.48 (2). – P.173-177.
- 29 Maluszynski M., Szarejko Y., Sigurbjrnsson B. Haploidy and mutation techniques / In: Jain S.M., Sopory S.K. Veilleux R.E. (eds) *In vitro* haploid production in higher plants / Kluwer, Dordrecht. – 1996. – Vol.1.
- 30 Szarejko Y., Forster B. P. Doubled haploidy and induced mutation // *Euphytica*. – 2007. – Vol.158:359–370, p. 67–93.
- 31 Khan A.J., Hassan S., Tariq M. & Khan T. Haploidy breeding and mutagenesis for drought tolerance in wheat // *Euphytica*. – 2001. – Vol.120. – P.409–414.
- 32 Xu L., Zhang G.Q., Gu H.H., Zhou W.J. In vitro selection of herbicide resistance in microspore-derived embryos of oilseed rape (*Brassica napus* L.) // *Journal Agric.Biotechnol*. – 2005. – Vol.13. – P.411–415.
- 33 Жамбакин К.Ж., Затыбеков А.К., Волков Д.В., Шамякова М.Х. Мутагенез в культуре изолированных микроспор рапса // *Биотехнология. Теория и практика*. – 2015. – в печати №3.
- 34 Kabyl Zhambakin, Alibek Zatybekov, Dmitriy Volkov, Malika Shamekova. Production of rapeseed mutant lines by microspore-derived embryo culture // *Journal of Biotechnology*. – 2014. – Vol. 185. – P. 29-30.
- 35 Liu S., Wang H., Zhang J., Fitt B. D. L., Xu Z., Evans N., Liu Y., Yang W., Guo X. In vitro mutation and selection of doubled-haploid *Brassica napus* lines with improved resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* // *Plant Cell Rep*. – 2005. – Vol.24. – P.133–144.
- 36 Barro F., Fernandez-Escobar J., De La Vega M., Martin A. Doubled haploid lines of *Brassica carinata* with modified erucic acid content through mutagenesis by EMS treatment of isolated microspores // *Plant Breeding*. – 2001. – Vol.120. – P.262 – 264.
- 37 Krieg D.R. Ethyl-methanesulfonate-induced reversions of the bacteriophage T4rII mutants // *Genetics*. – 1963. – Vol. 48. – P.561-580.
- 38 Bernd Friebe, Peng Zhang – Shuhei Nasuda, Bikram S. Gill. Characterization of a knock-out mutation at the *Gc2* locus in wheat // *Chromosoma*. – 2003. – Vol.111. – P.509-517.
- 39 Raz Avni, Rongrong Zhao, Stephen Pearce, Yan Jun, Cristobal Uauy, Facundo Tabbita, Tzion Fahima, Ann Slade, Jorge Dubcovsky, Assaf Distelfeld. Functional characterization of *GPC-1* genes in hexaploid wheat // *Planta*. – 2014. – Vol.239. – P.313-324.
- 40 Feiz L., Beecher B. S., Martin J. M., Giroux M. J. In Planta Mutagenesis Determines the Functional Regions of the Wheat Puroindoline Proteins // *Genetics*. – 2009. – Vol.183. – P.853-860.
- 41 Mary Guttieri, David Bowen, John A. Dorsch, Victor Raboy, and Edward Souza Identification and Characterization of a Low Phytic Acid Wheat / *Crop Sci*. – 2004. – Vol.44. – P.418-424.
- 42 Adinda P. Derkx, Simon Orford, Simon Griffiths, M. John Foulkes, Malcolm J. Hawkesford. Identification of Differentially Senescing Mutants of Wheat and Impacts on Yield, Biomass and Nitrogen Partitioning // *Journal of Integrative Plant Biology*. – 2012. – Vol.54 (8). – P.555-566.
- 43 Daolin Fu, Cristobal Uauy, Assaf Distelfeld, Ann Blechl, Lynn Epstein, Xianming Chen, Hanan Sela, Tzion Fahima, Jorge Dubcovsky. A Kinase-START Gene Confers Temperature-Dependent Resistance to Wheat Stripe Rust // *Science*. – 2009. – Vol.323. 6. – P.1357-1360.

44 Nian Wang, Yajie Wang, Fang Tian, Graham J. King, Chunyu Zhang, Yan Long, Lei Shi, Jinling Meng. A functional genomics resource for *Brassica napus*: development of an EMS mutagenized population and discovery of *FAE1* point mutations by TILLING // *New Phytologist*. – 2008. – Vol.180. – P.751–765.

45 Lu G., Zhang X.Y., Zou Y.J., Zou Q.C., Xiang X., Cao J.S. Effect of radiation on regeneration of Chinese narcissus and analysis of genetic variation with AFLP and RAPD markers // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* – 2007. – Vol.88. – P.319–327.

46 Xi Mengli, Sun Lina, Qiu Shuai, Liu Juanjuan, Xu Jin, Shi Jisen. In vitro mutagenesis and identification of mutants via ISSR in lily (*Lilium longiflorum*) // *Plant Cell Reports*. – 2012. – Vol.31. – P. 1043 – 1051.