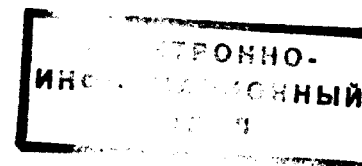


631.5  
С54



На правах рукописи

Соболева Галина Викторовна

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КУЛЬТУРЫ ТКАНЕЙ *IN VITRO*  
В СЕЛЕКЦИИ ГОРОХА

Специальность 03.00.23 – Биотехнология

Автореферат

Диссертации на соискание ученой степени  
кандидата сельскохозяйственных наук

Орел – 2005



631.5/24.6:635.656(043.3)

с 54

Диссертационная работа выполнена в лаборатории биотехнологии ГНЦ  
РФ ГНУ – Всероссийский научно-исследовательский институт зернобобовых

631.5 Соболёва Г.В. ийственных наук, профессор

рекур-

in vitro

еис. ских наук

е. Авто ских наук

о/м-

й сад имени Н.В. Цицина

30 на заседании диссер-  
государственном аграрном  
ла Родина, 69

ой библиотеке Орловского  
г. Орел, бульвар Победы,

2005 г.

Т.Ф.Макеева Т.Ф.Макеева

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Горох является ведущей зернобобовой культурой, широко возделываемой в различных регионах России. Традиционный селекционный процесс позволил достичь значительных успехов в повышении урожайности и качества зерна гороха.

Интенсификация современного сельскохозяйственного производства ставит перед селекционерами задачи создания высокоурожайных сортов гороха нового поколения, отличающихся высокой пластичностью, устойчивостью к болезням и вредителям, стрессовым факторам внешней среды. Для этого необходим поиск и привлечение современных достижений науки, ускоряющих и повышающих результативность селекционного процесса. Одним из наиболее динамично развивающихся направлений, ориентированных на создание нового исходного материала для селекции, является использование биотехнологических методов.

Культура клеток и тканей *in vitro* в настоящее время находит применение в широком диапазоне биологических исследований. Методы регенерации *in vitro* в селекции гороха используются явно недостаточно. В связи с этим изучение возможности использования культуры тканей *in vitro* в селекции гороха является актуальным.

**Цель работы** состояла в разработке методов культивирования тканей гороха *in vitro*, получении растений-регенерантов с последующей их морфологической оценкой.

**В задачи исследований входило:**

- определение оптимальных составов питательных сред для индукции каллусогенеза, морфогенеза и ризогенеза в культуре соматических тканей гороха;
- разработка эффективной системы активного пролиферационного и регенерационного процессов в длительно культивируемых каллусных тканях;
- разработка условий получения растений-регенерантов в культуре длительно пассируемых каллусов гороха;
- сравнительный морфологический анализ растений-регенерантов, полученных в культуре длительно пассируемых каллусов гороха;
- разработка метода отбора устойчивых к действию осмотического стресса каллусных линий гороха;
- морфофизиологический анализ растений-регенерантов, полученных на селективных средах с осмотически активными веществами;
- апробация методики клонального микроразмножения на сортах гороха селекции ВНИИЗБК;

**Научная новизна.** Впервые разработан метод длительного субкультивирования каллусов гороха с последующим получением корнесобственных растений-регенерантов. Выявлена соматоклональная изменчивость растений-регенерантов по массе 1000 семян, форме листа и длине стебля. Разработан метод отбора *in vitro* устойчивых к осмотическому стрессу каллусов гороха. Получены осмоустойчивые регенерантные линии гороха.

**Практическая значимость работы.** Определены направления использования культуры тканей *in vitro* в селекционных программах. В целях сохранения и ускоренного размножения ценного селекционного материала рекомендуется метод микроразмножения. Для расширения спектра исходного материала в селекции гороха рекомендуется использовать систему длительно пассируемых каллусных тканей. Разработана схема селекции *in vitro* гороха на осмоустойчивость. Выделены ценные для селекции генотипы гороха.

**Апробация работы.** Основные положения и результаты диссертационной работы были представлены на научных конференциях: «Биологические основы интенсивного растениеводства» (Орел, 1993), «Регуляторы роста и развития растений» (Москва, 1995), «Актуальные проблемы биотехнологии в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 1996, 2000, 2004), IV съезде общества физиологов России «Физиология растений – наука III тысячелетия» (Москва, 1999), I и II Московских международных конгрессах «Биотехнология – состояние и перспективы развития» (Москва, 2002, 2003), VIII международной конференции «Биология культуры клеток *in vitro* и биотехнология» (Саратов, 2003), «Физиологические аспекты продуктивности растений» (Орел, 2004).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, из них 5 на английском языке.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из общей характеристики, шести глав, выводов, предложений и рекомендаций для селекции, списка литературы, приложений. Диссертация изложена на 164 страницах машинописного текста, включает 33 таблицы в тексте и 8 в приложении, 22 рисунка. Список цитируемой литературы содержит 303 наименования, из них 104 на иностранном языке.

## 1. Обзор литературы

Приведены данные о современном состоянии исследований по разработке методов культуры клеток и тканей *in vitro* и возможностях их использования в селекционно-генетических программах.

Литературный анализ свидетельствует о том, что регенерация растений гороха *in vitro* до настоящего времени остается достаточно затрудненной. До сих пор не существует единых, эффективных, легко воспроизводимых методик регенерации.

## 2. Условия, материал и методика проведения исследований

Исследования проводились в течение 1993-2004 гг. в лаборатории биотехнологии Всероссийского научно-исследовательского института зернобобовых и крупяных культур (г. Орел).

Материалом для исследований служили: сорта гороха посевного (*Pisum sativum* L.) - Зарянка, Орлус, Батрак, Орловчанин, Филби; новые линии оригинального морфотипа гороха «хамелеон» селекции ВНИИЗБК, отличающиеся ярусной гетероморфностью листьев - Аз 26, Аз 92-2210, Аз 93-1964; образец гороха красивого (*Pisum formosum* (Stev.) Alef.).

За основу при работе с культурой тканей гороха была принята методика, предложенная Р.Г. Бутенко (1964). В качестве первичных эксплантов использовали верхушки или семядольные узлы 3-5 дневных асептических проростков гороха. Семена стерилизовали поэтапно: хромовой смесью (55% раствор бихромата калия в концентрированной серной кислоте) – 1 мин; промывка стерильной дистиллированной водой; 96% этанолом – 10 мин; промывка стерильной дистиллированной водой; 0,6% водным раствором хлоргексидиндиглюконата натрия – 5 мин; пятикратная промывка стерильной дистиллированной водой. Стерильные семена проращивали в термостате, при температуре 26°C, на двух слоях влажной стерильной фильтровальной бумаги в чашках Петри по 5-10 семян. Для инициации каллусогенеза первичные экспланты измельчали скальпелем и помещали на поверхность агаризованных питательных сред.

В качестве питательных сред использовали среды с минеральной основой MS (Murashige T., Skoog F., 1962) или B5 (Gamborg O.L. et al., 1968). В качестве регуляторов роста использовали: 6-бензиламинопурин (БАП), индолил-3-уксусную кислоту (ИУК), α-нафтилуксусную кислоту (НУК), индолил-3-масляную кислоту (ИМК). Концентрации и соотношение регуляторов роста в питательных средах приведены в процессе обсуждения результатов. Все культуры выращивали при температуре 25°C, 16-часовом фотопериоде и освещенности 2000 лк.

Осмотический стресс моделировался введением в питательные среды полиэтиленгликоля (ПЭГ) с молекулярной массой 6000 в различных концентрациях. Продолжительность пассажа составляла 45...50 суток.