

20.05.2004

К 72

Справочно-
информационный
отдел

На правах рукописи

Досм

КОСТЮЧЕНКО ДИНА АЛЕКСЕЕВНА

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ РАСШИРЕНИЯ
ИСХОДНОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ ЛЮПИНА**

03.00.23 – биотехнология

Автореферат диссертации на соискание ученой
степени кандидата сельскохозяйственных наук

Формат 60x84 1/16 Тираж 100 Объем 1 п.л.
Брянская государственная инженерно-технологическая академия
Редакционно-издательский отдел

Орел - 2004

ОГАУ
БИБЛИОТЕКА
б/л

Работа выполнена в отделе физиологии и биотехнологии Всероссийского научно-исследовательского института люпина; в лаборатории кафедры лесных культур и почвоведения Брянской государственной инженерно-технологической академии.

Научный руководитель - доктор сельскохозяйственных наук,
профессор Лихачев Борис Степанович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Лихачева Нинель Ефимовна

КОНТРОЛЬНЫЙ ЛИСТОК
СРОКОВ ВОЗВРАТА

доктор биологических наук
Лихачев Леонид Викторович

КНИГА ДОЛЖНА БЫТЬ
ВОЗВРАЩЕНА НЕ ПОЗЖЕ
УКАЗАННОГО ЗДЕСЬ СРОКА

Орловский государственный университет

Колич. пред. выдач

7 2004г. в 14⁰⁰ час на заседании
01 при Орловском государственном
019, г.Орел, ул. Генерала Родина, 69

в библиотеке Орел ГАУ: г. Орел,

или прислать отзыв в двух экземплярах,

Орел 2004г.

Т.Ф. Макеева

Макеева Т.Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Повышению результативности селекционного процесса должно способствовать совершенствование его технологии. В этом плане большое значение имеет качественно новое изучение генофонда культурных растений, направленное на выявление генетических источников и доноров селективируемых признаков. Для этого необходимо расширение исследований по всем направлениям, имеющим отношение к селекции, и особенно по частной генетике и биотехнологии, как в целях создания нового исходного материала, так и для выявления морфологических, физиологических, биохимических и т.д. маркеров селективируемых признаков.

В этой связи нами проведены исследования возможностей использования биотехнологических приемов в расширении генофонда исходного материала люпина – культуры, обладающей огромным биологическим и экономическим потенциалом.

Новые разработки, в которых используются культуры клеток и тканей, а также методы генной инженерии значительно сокращают затраты времени и труда на создание новых исходных форм для селекции. Техника рекомбинантных ДНК и ее последовательное применение в селекции растений способствует преодолению барьеров, препятствующих межвидовому скрещиванию, что особенно актуально для люпина. Она позволяет увеличить генетическое разнообразие, которое существенно пострадало из-за широкого распространения ограниченного числа высокопродуктивных сортов.

Быстрое внедрение нового сорта в практику сдерживается невозможностью получения большого количества семян или посадочного материала для вегетативного размножения в течение одного сезона. Это препятствие устраняется с помощью биотехнологии, которая предлагает селекционерам эффективный и быстрый метод микроразмножения растений.

Цель работы – изучить способность разных видов люпина к клональному микроразмножению и генетической трансформации.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

- оценить разные органы растений люпина по способности к каллусообразованию и регенерации;
- изучить морфо- и ризогенез в разных условиях культивирования;
- экспериментально подобрать наиболее эффективные питательные среды для клонального размножения разных видов люпина;
- установить возможность использования культуры незрелых зародышей в сохранении ценных генотипов люпина;
- получить растения-регенеранты из различных органов люпина;
- отработать методику генетической трансформации клеток люпина с помощью агробактерий.

Научная новизна. Выявлены особенности пролиферации верхушечных и пазушных почек при культивировании *in vitro* 16 перспективных сортов и сортообразцов желтого, 10 сортов узколистного, 4 сортов белого, а также многолистного люпина. Установлена зависимость умножения и развития побегов от количественного состава среды, содержания гормонов и режима пассирования. Определены наиболее эффективные среды для корнеобразования разных видов люпина. Предложены схемы для регенерации растений из незрелых зародышей желтого, узколистного и белого люпина. Впервые получена каллусная ткань узколистного люпина, трансформированная с помощью *Agrobacterium tumefaciens* (pBLHL3Δ) и приобретающая в результате трансформации устойчивость к канамицину.

Практическая значимость результатов исследования. Предложены схемы регенерации растений из незрелых зародышей узколистного, желтого и белого люпина. Разработаны условия для этапа адаптации растений-регенерантов к культивированию *in vivo*. Доказана возможность использования методов генетической трансформации тканей люпина с помощью агробактерий при создании принципиально нового исходного материала. Часть полученных регенерантов узколистного (АТ-Д-2-Г/1) и желтого люпина (Искорость) используется в селекционных программах.

Обоснованность выводов и достоверность результатов исследований подтверждается достаточным объемом экспериментального материала, собранного и обработанного с использованием современных методов исследований и ЭВМ, получением из каллусов растений-регенерантов и генетически измененных форм, использованием их в селекционных программах.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Видовая и сортовая специфичность реакции люпина на разные питательные среды и другие условия культивирования *in vitro*.
2. Схемы и условия клонального микроразмножения разных видов люпина.
3. Эффективность корнеобразования и адаптации к естественным условиям культивируемых видов люпина.
4. Способность люпина к генетической трансформации с помощью *Agrobacterium tumefaciens* (pBLHL3Δ).

Личный вклад автора. Разработка программы и методики исследований, получение, обработка, анализ и обобщение экспериментального материала, формулирование общих выводов по результатам выполненной работы, подготовка докладов и статей, оформление диссертации выполнены самостоятельно.

Апробация результатов НИР. Основные положения диссертационной работы докладывались и обсуждались ежегодно на Ученом совете Всероссийского научно-исследовательского института люпина (1989-1995 гг.), научно-практической конференции "Ускорение научно-технического процесса в агропромышленном комплексе Брянской области" (Брянск, 1992), межрегиональной научно-практической конференции «Биологический и экономический потенциал люпина и пути его реализации» (Брянск, 1997), Саввичевских научных чтений (Брянск: БГСХА, 2003, 2004), на научной конференции «Вклад ученых и специалистов в национальную экономику» (Брянск: БГИТА, 2004).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 124 страницах машинописного текста, состоит из введения, трех глав, выводов, практических рекомендаций, списка использованных источников и приложений. Она иллюстрирована 29 таблицами, 22 рисунками, список использованных источников включает 216 наименований, в том числе 133 на иностранных языках..

Объекты исследований. Объектами исследований являлись верхушечные и пазушные почки, незрелые зародыши, проростки, каллусные ткани видов люпина: желтого (*Lupinus luteus*), узколистного (*L. angustifolius*), белого (*L. albus*) и многолистного (*L. polyphillus*).

Методы исследований. Для работы с культурой ткани использовали модифицированную методику Р.Г.Бутенко (1964).

Семена подвергались поверхностной стерилизации: 20 мин в 96% этаноле, 15 мин в 0,1% растворе диазида с последующей пятикратной отмывкой стерильной водой. Стерильные проростки получали, высевая стерильные семена на "голодный" агар 0,8%. Для стерилизации тканей вегетирующих растений (зародышей, проростков, полученных из нестерильных семян, использовали метод, предложенный фирмой "Колбиохим-Беринг" (Fitter, Krikorian, 1982).

Используемые питательные среды: Мурасиге-Скуга (Murashige, Skoog, 1962); Гамборга В5 (Gamborg, Miller, Ojima, 1968); Линсмайера-Скуга (Sroga, 1983); Смирнова (Смирнов, 1970); Нича (Kyte, 1988); Хеллера (Kyte, 1988); Торпи (Rundolf, Kocks, 1985).

Штаммы *Agrobacterium tumefaciens* A277, A281, A348, 1D1, C58 и *A. rhizogenes* A8196, 15834 и A4b выращивали в жидкой питательной среде LB (Zhan X. et al., 1988) или на чашках Петри. Препарат плазмиды pBLHL3Δ, несущей ген запасного белка ячменя – гордеина и маркерный ген устойчивости к канамицину, был любезно предоставлен институтом Общей генетики РАН. Для дальнейших исследований плазмиду трансформировали в штамм *Escherichia coli* HB101 и затем выделяли в препаративных количествах по методикам, описанным Р. Дэвисом (1984). По этим же методикам проводили трансформацию *A. tumefaciens* A281.

Трансформация каллусных клеток люпина агробактериями проводилась кокультивированием на агаризованной среде, отбор трансформантов вели на среде, содержащей антибиотик ампициллин (цефотаксим).

Статистическая обработка. Опыты проводили в трехкратной повторности. Полученные данные после статистической обработки представили в виде $M \pm m$, где M – математическое ожидание, а m – стандартная ошибка среднего (Снедекор, 1961; Доспехов, 1979).