

В. Н. Шмаков¹
Ю. М. Константинов^{1,2}

¹Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия
²Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия
(E-mail: shmakovv@sifibr.irk.ru, yukon@sifibr.irk.ru)

Культура клеток *in vitro* в изучении внутривидового генетического полиморфизма у *Pinus sibirica* Du Tour

Аннотация: Изучены характеристики каллусогенеза у деревьев сосны сибирской (*Pinus sibirica*) двух популяций: контрольной популяции и популяции элитных (плюсовых) деревьев. Для популяции плюсовых деревьев появление каллусной культуры на эксплантах почек и хвои происходило в более ранние сроки по сравнению с представителями контрольной популяции. Установлены различия в скорости роста каллусных культур исследуемых популяций для первых 2-х месяцев культивирования. Делается заключение, что метод культуры клеток *in vitro* может служить эффективным способом дифференциации генотипов *P. sibirica*.

Ключевые слова: *Pinus sibirica*, каллусная культура, дифференциация генотипов.

DOI: <https://doi.org/10.32523/2616-7034-2020-133-4-69-73>

Кедр сибирский, или сосна кедровая сибирская (*Pinus sibirica* Du Tour) является одним из основных лесообразующих и хозяйственно-ценных видов и имеет обширный природный ареал: вид распространен в Западной и Восточной Сибири, Северной Монголии, на Урале, Восточном Казахстане и [1, 2]. В пределах своего ареала кедр сибирский, являясь важным элементом формации темнохвойной тайги, образует как чистые насаждения (кедровники), так и смешанные - с пихтой сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.) и елью сибирской (*Picea obovata* Ledeb.). В настоящее время с учетом обширности природного ареала и значительной хозяйственной ценностью большое внимание уделяется генетико-селекционным исследованиям сосны кедровой. При этом организация лесовоспроизводства на традиционной основе решается путем создания постоянной лесосеменной базы как путем отбора плюсовых деревьев, так и формированием насаждений, характеризующихся значительным генотипическим разнообразием [3]. Согласно «Указаниям по лесному семеноводству в Российской Федерации» отобранные по фенотипическим признакам плюсовые растения подлежат испытанию по потомству [4]. Основные положения методики закладки испытательных культур предусматривают длительные и трудоемкие манипуляции. Многообещающим, с нашей точки зрения, подходом в подобных работах является использование метода культуры тканей и клеток растений, который позволяет проводить скрининг и детальные исследования генетических механизмов, обеспечивающих проявление хозяйственно-ценных признаков у представителей видов хвойных.

Целью настоящей работы было изучение возможности использования характеристик каллусогенеза у *P. sibirica* для дифференциации популяций, представляющих ценность в лесохозяйственной деятельности.

Материалы и методы исследования

Растительный материал. Материалом для данной работы послужили 7 деревьев сосны сибирской контрольной популяции (условно пронумерованные от 1 до 7) и 8 представителей популяции плюсовых деревьев, используемых для получения привоя и обозначенных (согласно учетным документам Слюдянского лесхоза Иркутской области), соответственно, как 265/29, 273/37, 55/19, 50/4, 48/2, 217/11, 267/31. Для каждого генотипа использована выборка из 6-ти эксплантов почек и 3-х эксплантов хвои.

Условия культивирования. Для инициации и субкультивирования каллусных культур *P. sibirica* использовали среду следующего состава: макро- и микросоли по Мурашиге и Скуту [5, 6] с добавлением 0,4 мг/л тиамина, 0,1 мг/л пиридоксина, 0,5 мг/л никотиновой кислоты, 100 мг/л инозитола, 200 мг/л гидролизата казеина и 20 г/л сахарозы. В качестве регуляторов роста использовали 2,4 D (1 мг/л) и БАП (0,1 мг/л). Экспланты и полученные из них каллусы культивировались в темноте при постоянной температуре 250С. Согласно предварительным экспериментам, наиболее приемлемым для получения каллусных культур растительным материалом являются хвоя и почки взрослых деревьев. В связи с этим для экспериментов брали ветви верхней трети кроны (примерно 3-4 см) с хвоей и почками. Перед стерилизацией хвою удаляли и стерилизовали отдельно от почек с участками несущих побегов. Процедура стерилизации включала следующие этапы:

1. Обработка материала раствором, содержащим 0,1% этилртути-тиосульфата натрия (Sigma, США), 0,75% хлорамина и 0,3% детергента Twin-80 (Ferak, ФРГ) в течение 15 мин.
2. Выдерживание в течение 2 мин в 70% растворе этанола (с добавлением HCl: на 100 мл раствора этанола 1 капля концентрированной кислоты) [7].
3. Трехкратная отмывка в стерильной дистиллированной воде.

Для получения эксплантов стерильные почки с участками несущих побегов переносили на стерильные фильтры (в чашках Петри). После удаления покровных чешуй из средних частей почек вырезали поперечные диски толщиной 2-3 мм и помещали срезом на среду.

В качестве эксплантов из хвои (размером до 1 см) использовали только проксимальную часть хвои длиной до 1 см. На среду экспланты помещали горизонтально.

Частоту каллусообразования рассчитывали как отношение числа эксплантов с каллусом к общему числу эксплантов и выражали в % [8].

Скорость роста каллусов оценивали по формуле:

$$I = (m_i - m_0)/m_0,$$

где m_0 - исходная масса каллуса; m_i - масса каллуса к моменту пересадки.

Скорость роста определяли путем оценки изменений объема каллуса в течение первых двух месяцев культивирования.

Результаты

Исследуемые образцы кедра сибирского (за исключением генотипов № 1 и 55/19, у которых отсутствовал каллусогенез на хвое) были способны к каллусообразованию на обоих типах эксплантов (хвоя и почки). Тем не менее, они существенно различались по времени начала образования каллуса. У плюсовых генотипов появление каллусной культуры отмечено на 6-10-е сутки (на почках) и на 15-18-е сутки (на хвое), тогда как у контрольных генотипов это происходило только на 7-12-е сутки (на почках) и 20-31-е сутки (на хвое) от начала инициации каллуса (рис. 1).

Рис. 1

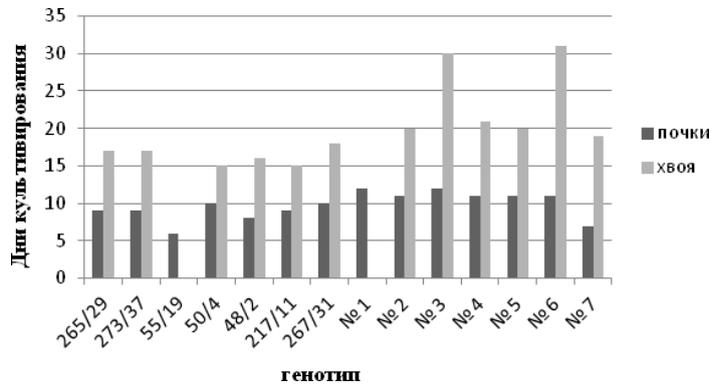


Рис. 1. Инициация каллусной культуры на эксплантах почек и хвои деревьев *Pinus sibirica* контрольной и плюсовой популяций.

Используемые обозначения: деревья контрольной популяции: №1, №2, №3, №4, №5, №6, №7; деревья плюсовой популяции: 265/29, 273/37, 55/19, 50/4, 48/2, 217/11, 267/31.

Частота каллусогенеза варьировала от 33 до 100 % при использовании эксплантов почек и от 0 до 67 % для эксплантов из хвои. При этом данный показатель был существенно выше у представителей популяции плюсовых деревьев (данные не представлены).

Значительно различалась также скорость роста каллусных культур в первые 2 месяца культивирования (рис. 2). Данный показатель оценивался путем еженедельного измерения объема каллусов, полученных на эксплантах почек. Установлено, что средняя скорость роста каллусов выше у представителей популяции плюсовых деревьев, начиная с 4-ой недели культивирования и сохранялась таковой вплоть до 7-ой недели культивирования.

Рис. 2

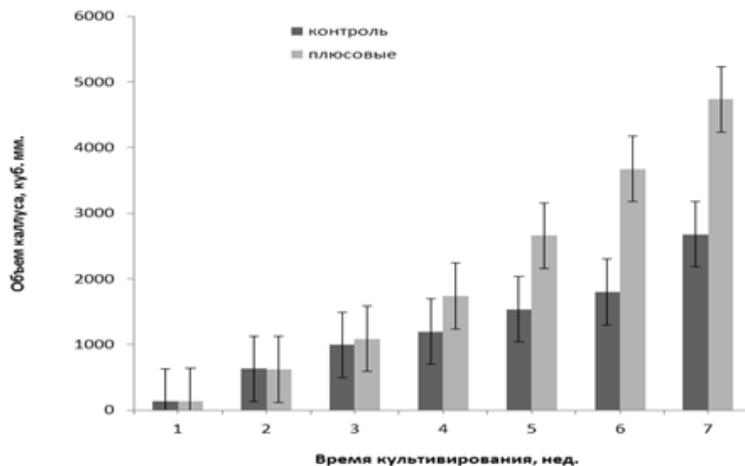


Рис. 2. Ростовой активность каллусных культур, полученных от деревьев *Pinus sibirica* плюсовой и контрольной популяций.

В качестве эксплантов для инициации каллусогенеза использовались почки. Приведены средние значения объема каллусной культуры, полученной от 7-8 генотипов каждой популяции + средне-арифметическое отклонение.

Обсуждение. Результаты настоящего исследования хорошо согласуются с имеющимися на сегодняшний день данными других исследователей, изучавших каллусогенез у различных видов высших растений. Так, способность к каллусообразованию, темп и тип роста культуры клеток зависят не только от состава среды, условий выращивания, физиологического состояния растений-доноров и типа экспланта *9-11+. Известно, что одинаковые по возрасту и тканевой принадлежности первичные экспланты, взятые от растений одного вида, выращиваемые в одинаковых условиях, отличаются в зависимости от исходного генотипа (сорта, линии) по частоте каллусообразования и интенсивности роста клеточной культуры *12 - 16+. Однако подобного рода исследования с использованием в качестве растительного объекта деревьев сосны сибирской (*Pinus sibirica*) ранее не проводились. В соответствии с полученными в данной работе результатами каллусогенез, полученный на основе эксплантов почек, позволяет четко дифференцировать популяции контрольных и плюсовых деревьев *Pinus sibirica*.

Заключение. В настоящей работе впервые установлена возможность использования каллусной культуры для дифференциации контрольной популяции и популяции плюсовых деревьев *P. sibirica*. Очевидно, что данный подход может найти свое применение в исследованиях лесной генетики, имеющих целью скрининг генотипов с хозяйственно-ценными признаками.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Список литературы

1. Рысин Л.П. Кедровые леса России / Л.П. Рысин. - М.: Тов-во науч. изданий КМК, 2011. - 240 с.
2. Farjon A.A. Handbook of the World's Conifers / A. Farjon. - LeidenBoston: Brill, 2010. - Vol. II - 1111 p.
3. Малаховец П.М. Лесные культуры / П.М. Малаховец - Архангельск: ИПЦ САФУ, 2012. - 222 с.
4. Указания по лесному семеноводству в Российской Федерации. Под ред. Сергеева М.М. - М.: ВНИИЦ лесресурс, 2000. - 197 с.
5. Murashige T., Scoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* - 1962. - V. 15. - P. 473-497.
6. Скрипаченко В. В. Выращивание *in vitro* тканей проростков трех видов сосны // *Физиология растений.* - 1982. - Т. 29. - № 1. - С. 205-211.
7. Bonga J.M. Adventitious shoot formation in cultures of immature female strobili of *Larix decidua* // *Physiol. Plant.* - 1984. - V.62. - P. 416-421.
8. Мишарина Е.А., Оводова Р.Г., Бушнева О.А., Оводов Ю.С. Каллусообразование *Silene vulgaris* (Moench) Garcke *in vitro* // *Растительные ресурсы.* - 1999. - № 2. - С. 88-95.
9. Wernicke W., Milkovits L. Development gradients in wheat leaves – Response of leaf segments in different genotypes cultured *in vitro* // *J. Plant Physiology.* - 1984. - V. 115. - №1. - P. 49-58.
10. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений 3. Каллусообразование *in vitro* // *Биополимеры и клетка.* - 1997. - Т.13. - №5. - С. 362-371.
11. Gonzalez J.M., Friero E., Jouve N. Influence of genotype and culture medium on callus formation and plant regeneration from immature embryos of *Triticum turgidum* Desf. cultivars // *Plant Breeding.* - 2001. - V. 120. - P. 513-517.
12. Izumi I., Fumio K., Hyoji N. Diallel analysis of callus formation ability in anther culture of rice // *Jap. J. Genet.* - 1991. - V.41. - № 1. - P. 153-162.
13. Чуб В.В., Власова Т.А., Бутенко Р.Г. Каллусогенез и морфогенез в культуре генеративных органов весеннецветущих видов *Crocus L.* // *Физиология растений.* - 1994. - Т. 41. - №6. - С. 815-820.

14. Мигранова И.Г., Леонова И.Н., Салина Е.А., Чураев Р.Н., Мардамшин А.Г. Влияние генотипа и типа специализации тканей экспланта на способность каллусной ткани борца северного *Aconitum serpentrionale* Koelle к длительному культивированию *in vitro* // Биотехнология. - 2002. - № 2. - С. 37-41.
15. Schween G., Schwenkel H.-G. Effect of genotype on callus induction, shoot regeneration, and phenotypic stability of regenerated plants in the greenhouse of *Primula ssp.* // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2003. - V. 72. - P. 53-61.
16. Константинов Ю.М., Шмаков В.Н. Межвидовая и внутривидовая дифференциация сибирских видов *Larix* с использованием метода культуры клеток *in vitro* // Сибирский экологический журнал. - 2005. - № 4. - С. 583-587.

В.Н. Шмаков¹, Ю.М. Константинов^{1,2}

¹Ресей Ғылым академиясының Сібір бөлімі,

Өсімдіктер физиологиясы және биохимиясы институты, Иркутск, Ресей

²Иркутск мемлекеттік университеті, Иркутск, Ресей

Pinus sibirica du Tour-да ішкі генетикалық полиморфизмді зерттеудегі *in vitro* жасуша мәдениеті

Аңдатпа. Сібір қарағайы (*Pinus sibirica*) ағаштарындағы каллусогенездің сипаттамалары екі популяцияда зерттелді: бақылау популяциясы және элиталық (артықшылығы бар) ағаштардың популяциясы. Ағаштардың популяциясына бүршіктер мен инелердің эксплантында каллус мәдениетінің пайда болуы бақылау популяциясының өкілдерімен салыстырғанда ертерек пайда болды. Өсірудің алғашқы 2 ай мерзімінде зерттелген популяциялардың каллус дақылдарының өсу қарқынында айырмашылықтар анықталды. *In vitro* жасуша мәдениеті әдісі *P. sibirica* генотиптерін саралаудың тиімді әдісі бола алады деген қорытынды жасалады.

Түйін сөздер: *Pinus sibirica*, каллустік мәдениет, дифференциация генотиптер дифференциясы.

V.N. Shmakov¹, Yu.M. Konstantinov^{1,2}

¹*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of the Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia*

²*Irkutsk State University, Irkutsk, Russia*

(E-mail: shmakov@sifibr.irk.ru, yukon@sifibr.irk.ru)

Cell culture *in vitro* in studying of intraspecies genetic polymorphism in *Pinus sibirica* Du Tour

Abstract: The authors have studied characteristics of callusogenesis in Siberian pine (*Pinus sibirica*) trees of two populations: the control population and the population of elite (plus) trees. For the population of plus trees, the appearance of callus culture on the explants of buds and needles occurred earlier than in the control population. Differences in the growth rate of callus cultures of the studied populations have been established for the first 2 months of cultivation. It is concluded that the *in vitro* cell culture method can serve as an effective method for differentiating of *P. sibirica* genotypes.

Kew words: *Pinus sibirica*, callus culture, differentiation of genotypes.

Сведения об авторах:

Шмаков В.Н. – к.б.н., с.н.с. лаборатории генетической инженерии растений СИФИБР СО РАН Иркутск, Россия.

Константинов Ю.М. – автор для корреспонденции, д.б.н., профессор, заведующий лабораторией генетической инженерии растений СИФИБР СО РАН, Иркутск, Россия.

V. N. Shmakov – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Laboratory of Plant Genetic Engineering, SIFIBR SB RAS, Irkutsk, Russia.

Yu. M. Konstantinov – corresponding author, Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Plant Genetic Engineering of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia.