

СОХРАНЕНИЕ ГЕНОФОНДА ХВОЙНЫХ ВИДОВ СИБИРИ ПРИ ПОМОЩИ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА *IN VITRO* – СОВРЕМЕННОГО МЕТОДА БИОТЕХНОЛОГИИ

И.Н. Третьякова, А.В. Барсукова

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН
660036 Красноярск, Академгородок, 50; e-mail: culture@ksc.krasn.ru

В результате опытов по гибридизации кедров сибирского на клоновой прививочной плантации были получены шишки первого поколения с высокой семенной продуктивностью. Введением изолированных зародышей кедров сибирского и лиственницы сибирской в культуру *in vitro* путем подбора состава питательных сред была получена эмбрионально - суспензорная масса, соматические зародыши и растения - регенеранты. Наиболее активной пролиферацией обладала эмбрионная масса гибридных семян, полученная от гетерозисных деревьев опылителей с однолетним циклом развития женских шишек. Определены генотипы донорских растений лиственницы сибирской и сосны сибирской, способные давать чистые эмбрионные линии, соматические зародыши и растения - регенеранты.

Ключевые слова: соматические зародыши, эмбриональная масса, гетерозисные деревья, лиственница сибирская, сосна сибирская

As a result of experiments of hybridization of *Pinus sibirica* on clonally grafting plantation, cones of first generation with high seed productivity were obtained. Embryonal suspensor masses, somatic embryo and plant regeneration from zygotic embryos of Siberian pine and Siberian larch in culture *in vitro* by selection of composition of culture medium have been obtained. Embryonal masses of hybrid seeds from heterosis trees with annual cycle development of female cone have active growth. Genotypes of donor plants of Siberian larch and Siberian pine which produced pure embryonal line, somatic embryo and plant have been determined.

Key words: somatic embryo, embryonal mass, heterosis tree, Siberian larch, Siberian pine

ВВЕДЕНИЕ

Проблема сохранения генофонда основных лесобразующих видов России может быть решена при помощи сочетания классических методов селекции и современных методов биотехнологии, таких как соматический эмбриогенез, широко используемый в плантационном лесовыращивании за рубежом при реализации программы MVF (Multi Variety Forest). Соматический эмбриогенез имеет ряд преимуществ, по сравнению с другими методами клонального размножения. Этот эффективный метод регенерации растений позволяет сохранить генетические ресурсы в течение длительного периода времени, благодаря высокой продуктивности пролиферирующей эмбриональной массы (ЭМ) и ее способности подвергаться длительной криоконсервации (Park, 2002). С помощью соматического эмбриогенеза можно производить массовое тиражирование высокопродуктивных, устойчивых к паразитам чистых линий растений для создания лесосеменных плантаций (Lelu et al, 1994; Klimaszewska et al, 2002; Lelu- Walter et al, 2008).

Несмотря на быстрое развитие биотехнологии соматического эмбриогенеза хвойных, до сих пор не разработан комплексный селекционно - генетический подход и не полностью решены те аспекты фундаментальной проблемы морфогенеза (тотипотентность, детерминация и компетентность, дифференциация и дедифференциация), которые можно

решить на примере именно соматического эмбриогенеза, как модельной системы. Отсутствуют работы по сравнению цито-гистологического статуса морфогенных (эмбриональной массы) и не морфогенных каллусов различного происхождения во всей динамике их развития. Технология соматического эмбриогенеза до сих пор остается не разработанной для ряда видов хвойных, в том числе и видов, произрастающих на территории России (Третьякова и др., 2007; Белоруссова и др., 2008). Критическим моментом является процесс вызревания соматических зародышей, поскольку он влияет на жизнеспособность полученных зародышей, и их способность прорасти.

Сочетание селекционной стратегии размножения для улучшения хвойных видов – внутривидовой и межвидовой гибридизации, основано на использовании комплементарных признаков между родительскими генотипами, приводящими к гетерозису. Подбор родительских пар характеризующихся акселерацией генеративного цикла и признаками свойственными плюсовым деревьям, позволит получить потомство F1 с улучшенными наследственными свойствами. Использование биотехнологии соматического эмбриогенеза будет способствовать массовому тиражированию гибридных и гомозиготных чистых линий хвойных видов, что внесет неоценимый вклад в генетическое улучшение лесов России.

Цель исследования – разработка биотехнологии получения соматических зародышей и растений - регенерантов у гибридных семян, полученных при проведении работ по внутривидовой гибридизации у сибирских видов хвойных.

* Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 08-04-00107, № 09-04-10023к р-Сибирь-а № 09-04-98000 и № 09-04 98000 интеграционного гранта № 53

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследований служили деревья сосны сибирской (кедр сибирский, *Pinus sibirica* Du Tour), произрастающие в естественном древостое Западного Саяна и на клоновых прививочных плантациях Западно-Саянского Опытного лесного хозяйства, а также лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.), произрастающей в естественных и искусственных насаждениях, а также клоновых плантациях (Красноярский край). На клонах кедра сибирского и лиственницы сибирской проводились опыты по контролируемому опылению, с использованием в качестве опылителей плюсовых деревьев (№107, 277, 357, 492) и уникальных гетерозисных форм с однолетним развитием женской шишки дерева (106), а также деревьев лиственницы сибирской, устойчивых к лиственничной почковой галлице.

При проведении опытов по гибридизации (2005 - 2008 гг.) производилось опыление 6 - 12 клонов (каждый клон включал 12- 15 деревьев) пылью деревьев-опылителей. С опыленных клонов производился сбор шишек потомства первого поколения, половина которых шла на определение семенной продуктивности и качества семян. Зародыши семян другой половины шишек вводились в культуру *in vitro*.

При проведении работ по индукции соматического эмбриогенеза, семена стерилизовались и из них извлекались зародыши, которые вводились в культуру *in vitro*. Для инициации эмбриогенного каллуса (ЭК) из зиготических зародышей использовались базовые среды $\frac{1}{2}$ MS, MS (Murahsige et al., 1962), $\frac{1}{2}$ LV, LV, MSG (Plant cell, tissue, 1995) и MA (неопубликованные данные) с добавлением мезоинозита, L-глутамина, фитогормонов (2,4-Д и 6-БАП), сахарозы, а также агара или Gelrite. Для пролиферации ЭМ концентрация 6-БАП и сахарозы снижалась в 2- 4 раза (у разных видов по-разному). Эксперименты по индукции и пролиферации ЭК проводились в темноте при температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Для созревания соматических зародышей в среды добавлялись АБК, ИМК, сахароза, а также Gelrite. Культивирование проводилось при 16-ти часовом фотопериоде и температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Для проведения цитологического анализа использовались давленные препараты. Окраска эксплантов проводилась сафранином с добавлением капли метиленового синего. Статистическая обработка данных проводилась по стандартным методикам при помощи Microsoft Excel. Морфологические изменения фиксировались цифровой фотокамерой Fudjifilm FinePix S7000.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культура изолированных зародышей (соматический эмбриогенез). Введение изолированных зародышей семян кедра сибирского и лиственницы сибирской в культуру *in vitro* показало, что процесс реализации соматического эмбриогенеза у данных видов состоит из индукции ЭК, пролиферации эмбриональной массы (ЭМ), вызревания соматических зародышей и их прорастания. На индукционной среде под

действием гормонов 6-БАП и 2,4-Д соматические клетки зиготических зародышей лиственницы сибирской и кедра сибирского на 5-10 сут. культивирования начинали интенсивно растягиваться в длину и превращаться в эмбриональные трубки размером 200 - 300 мкм. Эмбриональные трубки в результате неравного деления образовывали мелкие эмбриональные клетки диаметром 39- 47 мкм. В течение 1 месяца эмбриональные клетки активно делились и образовывали эмбриональные глобулы, которые окружались эмбриональными трубками. Наблюдалось образование ЭМ. При пересадке ЭМ на пролиферирующие среды с пониженным содержанием цитокининов и сахарозы, вызывающих интенсивную пролиферацию, шел активный кливаж (рис. 1А). При субкультивировании ЭМ на базовых средах, содержащих АБК и ИМК, соматические зародыши приобретали биоплярную структуру: на одном из полюсов формировались примордии семядолей, на другом – зародышевый корешок (рис. 1Б).

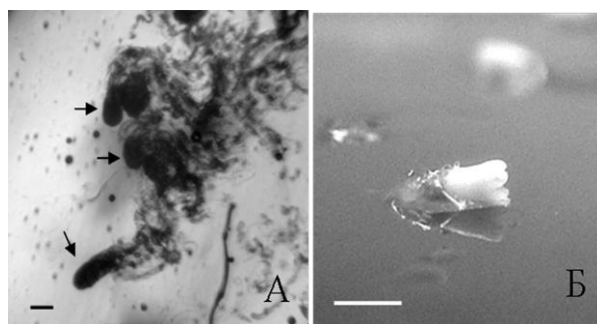


Рисунок 1 - Созревание соматических зародышей лиственницы сибирской на среде МА с АБК и ПЭГ: А – соматические зародыши на стадии кливажа (масштаб 300 мкм); Б – зрелый соматический зародыш (масштаб 1 мм)

Влияние генотипа дерева на рост ЭК и формирование соматических зародышей. Наблюдения за динамикой роста ЭК показали, что процессы инициации и пролиферации каллуса у разных генотипов идут с неодинаковой скоростью. Из 16 эксплантов плюсовых деревьев кедра сибирского выделился один индивидуум, у которого объем эмбриогенного каллуса в 2 - 3 раза превышал объем каллусов остальных плюсовых деревьев (рис. 2).

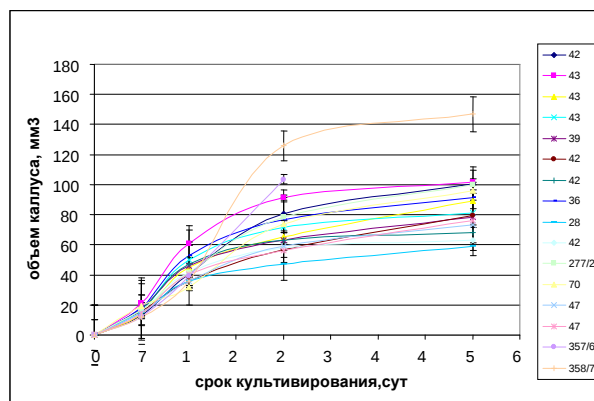


Рисунок 2 - Рост эмбриогенного каллуса у плюсовых деревьев кедра сибирского (цифрами обозначены номера деревьев)

Наиболее активное образование ЭК шло у клонов в вариантах опыления пыльцой гетерозисного дерева с однолетним формированием женских шишек (рис. 3).

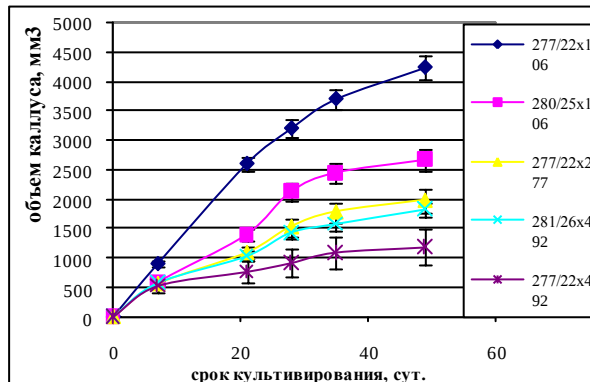


Рисунок 3 - Рост эмбрионного каллуса у гибридных зародышей семян, полученных в результате контролируемого опыления клонов пыльцой плюсовых деревьев (22x492, 22x277, 26x492) и гетерозисного дерева (22x1A, 25x1A)

Динамика роста ЭК и образование соматических зародышей у лиственницы сибирской происходило аналогично кедровому. Среди 30 генотипов лиственницы выделились 18 % генотипов, у которых шло интенсивное образование эмбрионного каллуса, у 57 % генотипов образование эмбрионного каллуса шло значительно слабее и у 13 % генотипов формирование эмбрионного каллуса вообще не наблюдалось. Особенно заслуживает внимание генотип донора лиственницы сибирской, который отличался устойчивостью к повреждению лиственничной почковой галлицей, у которого формирование эмбрионного каллуса шло со значительной скоростью. За 50 дней культивирования объем ЭК достигал 18990 мм³ (рис. 4).

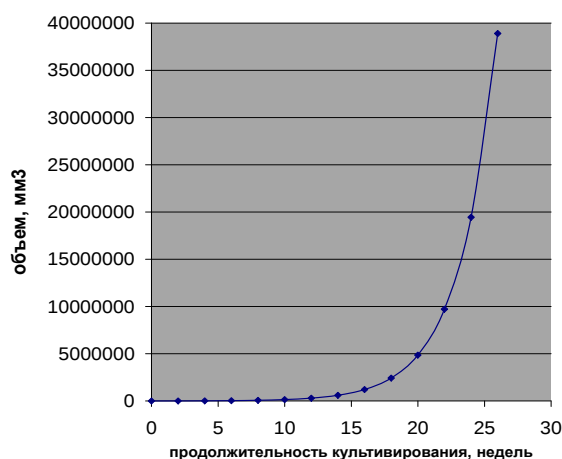


Рисунок 4 - Рост эмбрионного каллуса у лиственницы сибирской

За 6 мес. культивирования объем эмбриональной массы достиг 500000 мм³. На 1 мм² ЭСМ насчитывалось в среднем 75±4,6 шт. эмбриональных глобул. У данного генотипа наблюдалось активное образование соматических зародышей. На среде

вызревания насчитывалось до 380 штук зародышей на 1 гр. эмбрионного каллуса. Формировалась чистая эмбрионная линия.

Образование ЭК, его пролиферация, формирование и вызревание соматических зародышей у лиственницы сибирской занимает 4- 6 месяцев, у кедра сибирского 7- 10 месяцев. Аналогично зиготическим зародышам, морфогенез соматических зародышей включает последовательное прохождение стадий проэмбрио, кливажа, образование глобулярных и торпедообразных зародышей, после которых осуществляются процессы дифференцировки - формируются апексы побега и корня, гипокотиль и семядоли, наконец, происходит прорастание соматических зародышей. Реализация соматического процесса, требует применения разных химических соединений, в том числе фитогормонов и различных физических предобработок. Поэтому соматический эмбриогенез у хвойных видов можно использовать как модельную систему в эмбриологических исследованиях. С помощью эмбрионных культур были получены генетически улучшенные растения, которые будут подвергнуты криоконсервации, что позволит создать банк улучшенных генотипов.

ВЫВОДЫ

1. При введении изолированных зародышей кедра сибирского и лиственницы сибирской путем подбора состава питательных сред формировались эмбрионально - суспензорная масса, соматические зародыши и растения - регенеранты.
2. Наиболее активным ростом обладал эмбрионный каллус кедра сибирского, полученный от гетерозисных деревьев- опылителей с однолетним циклом развития женских шишек и лиственницы сибирской, полученный от дерева, устойчивого к лиственничной почковой галлице.
3. Определены генотипы донорских растений лиственницы сибирской и кедра сибирского, способные давать чистые эмбрионные линии, соматические зародыши и растения - регенеранты.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Белорусова, А.С. Третьякова И.Н. Особенности формирования соматических зародышей у лиственницы сибирской: эмбриологические аспекты/ А.С. Белорусова, И.Н. Третьякова // Онтогенез. - 2008. - Т. 39. - № 2 - С. 1-10.
- Третьякова, И.Н. Перспективы применения методов биотехнологии для размножения генетически ценных форм лесных древесных видов / И.Н. Третьякова, А.С. Белорусова, Н.Е. Носкова, С.С. Савельев, А.В. Лукина, А.В. Барсукова, М.В. Ижболдина, Ю.А. Череповский // Хвойные бореальной зоны. - 2007. - Т.24. - №2-3. - С. 309-318.
- Klimaszewska, K. Conifer somatic embryogenesis: I. Development / K. Klimaszewska, D.R. Cyr // Dendrobiology. - 2002. - V.48. - P. 31-39.
- Lelu, M.A. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*): Part 2. Control for germination and plantlet development / M.A. Le-

- lu, C. Bastien, K. Klimaszewska, P.J. Charest // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 1994. – V.36. - P. 117-127.
- Lelu-Walter, M-A. Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis / M-A. Lelu-Walter, M. Bernier-Cardou, K. Klimaszewska // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2008. – V.92. – P. 31–45.
- Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – V.15. - № 4. – P. 473-497.
- Park, Y-S. Implementation in conifers somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirement and development considerations / Y-S. Park // Ann. For. Sci. – 2002. – V.59. – P. 651-656.
- Plant cell, tissue and organ culture: fundamental methods / Eds. O.L. Gamborg, G.C. Phillips. Berlin: Springer-Verlag, 1995, 358 p.
-

Поступила в редакцию 24 ноября 2009 г.

Принята к печати 25 февраля 2010 г.