

УДК 576.5:57.085.23

НА ПУТИ К ПОЛУЧЕНИЮ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ КЛОНОВ ПЛЮСОВЫХ ДЕРЕВЬЕВ *PINUS SYLVESTRIS* L.

Р.В. Игнатенко, М.А. Еришова, О.В. Чирва, Н.А. Галибина

Институт леса — обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», Петрозаводск, Россия

Проведено изучение растений-доноров эксплантов *Pinus sylvestris* с Петрозаводской лесосеменной плантации, способных к инициации соматического эмбриогенеза, а также оценка формирования эмбриогенных клеточных линий на питательных средах MSG, с разным содержанием и источниками фитогормонов. Инициация соматического эмбриогенеза была отмечена у эксплантов отобранных с 2 из 9 исследуемых клонов плюсовых деревьев. Установлено, что эмбриогенные массы клеток образовывались с низкой частотой на всех исследуемых субстратах. Начальные этапы вызревания соматических зародышей регистрировали после семидневного выдерживания масс клеток на среде без гормонов, а затем на субстрате с АБК. По окончании эксперимента растения-регенеранты *Pinus sylvestris* получить не удалось.

Ключевые слова: соматический эмбриогенез, культура *in vitro*, фитогормоны, зародыши, сосна обыкновенная, лесосеменная плантация, Карелия.

Одним из перспективных направлений в области биотехнологического размножения хвойных растений является применение метода соматического эмбриогенеза [4; 15]. Данная технология позволяет получить большое количество растений с селекционно-значимыми признаками. Особенно это актуально для хвойных видов, которые тяжело поддаются клонированию с использованием традиционных методов селекции [3]. Так, например, к ним относится широко распространённое на территории Евразии растение – сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.). Технология соматического эмбриогенеза для *P. sylvestris* была впервые описана финскими исследователями в 1996 г. [10], на сегодняшний день протоколы получения растений-регенерантов модифицированы [8] и успешно применяются на практике. Однако в России получение клонов *P. sylvestris* с использованием данного метода в проанализированной нами литературе описано не было, хотя при помощи соматического эмбриогенеза в нашей стране были получены растения-регенеранты для *Pinus pumila* (Pall.) Regel [13], *Larix sibirica* Ledeb. [14] и *Picea abies* (L.) H. Karst. [9].

Ранее нами были проведены исследования, направленные на подбор условий культивирования [1], а также поиск маркеров для оценки растений-доноров эксплантов *P. sylvestris* [6; 7], что способствовало получению эмбриогенной культуры [2]. Целью данного исследования являлся подбор растений-доноров эксплантов *P. sylvestris* для инициации соматического эмбриогенеза, а также оценка формирования эмбриогенных клеточных линий на разных субстратах и их дальнейшего развития.

Сбор незрелых шишек *P. sylvestris* проводили на Петрозаводской лесосеменной плантации I порядка 05 и 12 июля 2023 г. Сумма эффективных температур (при базовой температуре +5°C) в эти дни составляла 500 и 564 °C, соответственно. Отбор растительного материала производили 5 июля с клонов плюсовых деревьев 516-7, 835-2, 864-2, 876-1, 962-4, 1025-3, 1026-3, 1147-3, 1191-2; 12 июля с клонов 516-7, 864-2, 876-1, 962-4, 1025-3, 1026-3. Шишки до момента введения в культуру хранили в холодильнике при температуре +4°C не более одного месяца.

Незрелые шишки выдерживали в 15% мыльном растворе в течение 10 минут, затем поверхность шишек очищали щёткой и промывали под проточной водой. В стерильных условиях шишки помещали в 96% этанол с добавлением нескольких капель ТВИН 20 и выдерживали в растворе 10 минут. После однократной промывки стерильной дистиллированной

водой шишки вскрывали стерильными инструментами и извлекали семена. Собранные семена погружали в 5% раствор гипохлорита натрия на 10 минут, и 15% перекись водорода на 5 минут с трехкратной промывкой стерильной дистиллированной водой после каждого стерилизующего агента. Обработанные семена в асептических условиях бокса микробиологической безопасности очищали от покровных чешуй и мегагаметофиты, содержащие незрелые зиготические зародыши, горизонтально помещали на поверхность питательной среды по 4 шт. в банку [1].

В качестве субстрата использовали питательные среды на основе MSG [12], которые отличались разным содержанием фитогормонов (табл. 1). В культуру *in vitro* было введено 1860 эксплантов, собранных с 9 клонов плюсовых деревьев *P. sylvestris*.

Таблица 1

Содержание компонентов в питательных средах MSG

Компоненты	Инициации			Пролиферац ии	Предсозрева ния	Созревания	Созревания по Malabadi
	1	2	3				
2.4-Д, μM	13.6	18	–	9.1	–	–	–
6-БАП, μM	2.2	9	9	2.2	–	–	–
НУК, μM	–	–	2.7				
АБК, μM	–	–	–	–	–	60	80
ПЭГ 6000, г/л	–	–	–	–	–	46	–
Уголь, г/л	–	–	–	–	1	–	–
Сахароза, г/л	10	10	10	10	20	20	–
Мальтоза, г/л	–	–	–	–	–	–	60
Агар, г/л	6	6	6	6	6	6	21.6

Спустя месяц культивирования часть эксплантов и массы клеток перенесли на среду пролиферации (табл. 1). Для созревания соматических зародышей эмбрионную ткань после 7 месяцев пролиферации помещали (1) на одну неделю на субстрат без гормонов (предсозревания), а затем на среду созревания или (2) предварительно высушивали на фильтровальной бумаге в течении 24 часов, а затем культивировали на питательной среде созревания, модифицированной Malabadi [5; 11]. Экспланты на питательных средах культивировали в термостате в темноте при температуре $23 \pm 1^\circ\text{C}$.

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

В результате исследования было установлено, что основная часть зиготических зародышей *P. sylvestris* в момент сбора шишек (05 и 12 июля) находилась на стадии развития – кливажной полиэмбрионии. Спустя 3-4 недели нахождения шишек в холодильнике при температуре $+4^\circ\text{C}$ большинство зародышей развились до стадии глобулярного лидирующего зародыша или глобулярного зародыша.

В первые две недели культивирования контаминации подверглись 472 экспланта (25% от общего числа эксплантов). Инфекция в большинстве случаев развивалась из мегагаметофитов *P. sylvestris*. Эти данные не учитывались при дальнейшем анализе.

Экструзия зародыша была зарегистрирована у эксплантов, собранных с деревьев 1025-3, 864-2, 876-1, в среднем на 20 ± 2 сутки эксперимента. Массы клеток формировались у эксплантов с клонов плюсовых деревьев 962-4 (1 шт.) и 864-2 (3 шт.). Данные культуры клеток являлись эмбрионными, поскольку в них образовывались соматические зародыши (рис. 1).

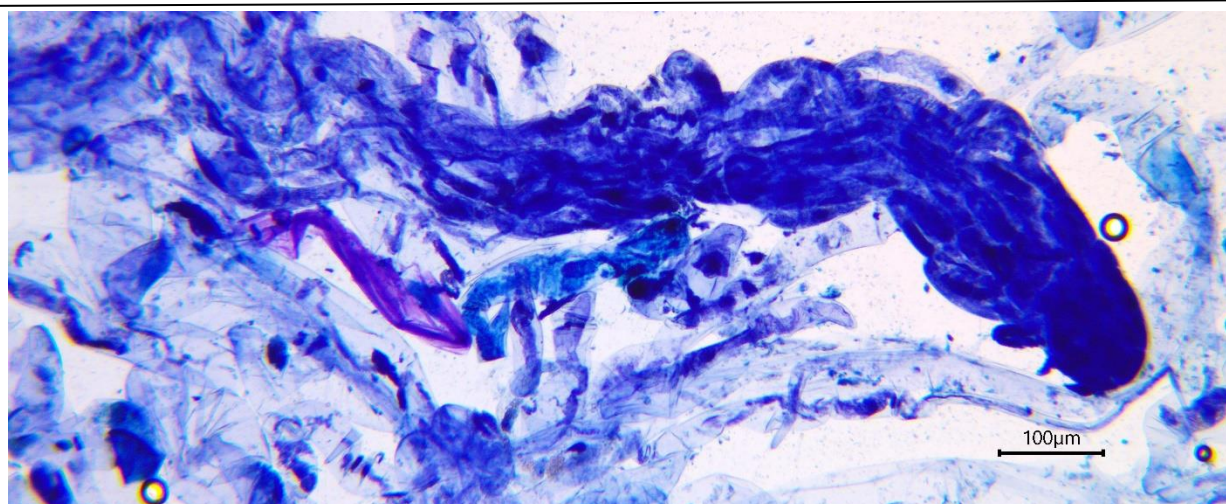


Рисунок 1. Глобулярный соматический зародыш *Pinus sylvestris*, окрашенный растворами сафранина и метиленового синего

Экструзия зародыша наблюдалась на всех средах инициации у 0.4-1.3% эксплантов, введенных в культуру *in vitro* (табл. 2). Доля эксплантов, образовавших эмбрионально-суспензорные массы на 16-38 сутки исследования, варьировала от 0.2 до 0.4% в зависимости от субстрата. После двух месяцев культивирования сохранились 2 клеточные линии, полученные от мегагаметофитов дерева 864-2.

Таблица 2

Частота образования экструзий и эмбрионных масс клеток *Pinus sylvestris* в культуре *in vitro*

Частота образования, %	Варианты среды инициации MSG		
	1	2	3
Экструзии	1.1	1.3	0.4
Эмбрионные массы клеток	0.3	0.2	0.4

Предварительно подсушенные в чашке Петри на фильтровальной бумаге эмбрионально-суспензорные массы, помещали на среду MSG, модифицированную по Малабади, однако на данном типе субстрата клеточные линии погибали. В тоже время при недельном культивировании на среде предсозревания наблюдали подсушивание культур, а при перемещении клеточных линий на субстрат, содержащий 60 μМ АБК, регистрировали начальные этапы созревания соматических зародышей (рис. 2). Спустя месяц культивирования дальнейшего развития зародышей не наблюдали. На среде пролиферации на 9-10 месяц культивирования клеточные линии прекращали свой рост и погибали.

Таким образом, в результате проведенных исследований было получено 4 эмбрионные культуры (0.3%) от эксплантов, собранных с двух клонов плюсовых деревьев *P. sylvestris* (864-2, 962-4), что составляет 22% от общего числа изученных генотипов растений-доноров в 2023 г. При этом формирование эмбрионально-суспензорных масс из мегагаметофитов, содержащих зародыши, клона 864-2 происходило второй год подряд [2]. Известно, что использование ранее экспериментально отобранных деревьев-доноров эксплантов способствует повышению частоты инициации соматического эмбриогенеза [10; 12]. Так, исследователи из Финляндии на протяжении последних 30 лет используют растительный материал для введения в культуру *in vitro* с плантации Финского научно-исследовательского института в Пункахарью [5; 8; 10; 12]. При этом производится контролируемое опыление наиболее успешных по инициации в культуре *in vitro* генотипов *P. sylvestris*.

В нашем исследовании инициация соматического эмбриогенеза происходила на питательных средах MSG с разными источниками и содержанием фитогормонов. Выдерживание культуры клеток на среде предсозревания, а затем перенесение ее на субстрат созревания способствовало дальнейшему развитию соматических зародышей. Однако получить растения-регенеранты не удалось. Возможно, повышение содержания АБК и источников углеводов в

питательной среде, как описано в работе Нагју с соавторами [8], будет оказывать благоприятное влияние на процесс созревания соматических зародышей.



Рисунок 2. Вызревание соматических зародышей *Pinus sylvestris* в культуре *in vitro*

Важно отметить, что в рамках проведенного исследования были установлены генотипы деревьев-доноров *P. sylvestris* на Петрозаводской лесосеменной плантации экспланты с которых способны к инициации соматического эмбриогенеза. А также сделан следующий шаг – начальные этапы вызревания соматических зародышей на субстрате с АБК – на пути к получению растений-регенерантов клонов плюсовых деревьев *P. sylvestris* с территории Карелии.

Благодарности. Работа выполнена за счет средств федерального бюджета по государственному заданию Карельского научного центра Российской академии наук (Институт леса КарНЦ РАН).

Библиографический список

1. Ершова М.А., Игнатенко Р.В., Новичонок Е.В., Чирва О.В., Галибина Н.А. Оптимизация условий стерилизации и культивирования эксплантов *Pinus sylvestris* (Pinaceae) // Растительные ресурсы. 2022. Т. 58, № 4. С. 431–446. <https://doi.org/10.31857/S0033994622040057>
2. Игнатенко Р.В., Галибина Н.А., Ершова М.А., Чирва О.В., Тихомирова С.И., Померанец А.К. Особенности соматического эмбриогенеза *Pinus sylvestris* и *Picea abies* // X Съезд общества физиологов растений России «Биология растений в эпоху глобальных изменений климата»: Всероссийская научная конференция с международным участием: тезисы докладов, Уфа, 18–23 сентября 2023 года. Уфа: Уфимский Федеральный исследовательский центр РАН. 2023. С. 161.
3. Раевский Б.В., Игнатенко Р.В., Новичонок Е.В., Прокопюк В.М., Куклина К.К. Современное состояние селекции и семеноводства хвойных пород // Известия вузов. Лесной журнал. 2022. № 6. С. 9–37. <https://doi.org/10.37482/0536-1036-2022-6-9-37>
4. Шуклина А.С., Третьякова И.Н. Соматический эмбриогенез видов рода *Pinus* в культуре *in vitro* // Успехи современной биологии. 2019. Т. 139, № 2. С. 184–195. <https://doi.org/10.1134/S004213241902008X>
5. Aronen T., Pehkonen T., Ryyänänen L. Enhancement of somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Pinus sylvestris* // Scandinavian Journal of Forest Research. 2009. Vol. 24, № 5. P. 372–383. <https://doi.org/10.1080/02827580903228862>
6. Chirva O.V., Ignatenko R.V., Ershova M.A. *Pinus sylvestris* L. mature seeds megagametophytes cultured *in vitro*. Influence of the genotype and the growth regulators content in nutrient medium on the initiation of callus formation // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2023. Vol. 152, № 2. P. 299–308. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02404-3>

7. Galibina N.A., Ershova M.A., Ignatenko R.V., Nikerova K.M., Sofronova I.N., Borodina M.N. Cytogenetic and biochemical characteristics of callus *Pinus sylvestris* L. // Russian Journal of Plant Physiology. 2023. Vol. 70, № 1. P. 10. <http://doi.org/10.1134/S1021443722602348>
8. Harju A., Heiska S., Julkunen-Tiitto R., Venäläinen M., Aronen T. Somatic embryogenesis of *Pinus sylvestris* L. from parent genotypes with high- and low stilbene content in their heartwood // Forests. 2022. Vol. 13, № 4. P. 557. <https://doi.org/10.3390/f13040557>
9. Ignatenko R.V., Chirva O.V., Ershova M.A., Galibina N.A., Teslyuk I.A. Assessing the ability of *Picea abies* (L.) H. Karst. plus tree clones from the middle taiga subzone of Karelia to somatic embryogenesis // Russian Journal of Plant Physiology. 2024. Vol. 71, № 25. P. 25. <https://doi.org/10.1134/S1021443724604531>
10. Keinonen-Mettälä K., Jalonen P., Euroala P., von Arnold S., von Weissenberg K. Somatic embryogenesis of *Pinus sylvestris* // Scandinavian Journal of Forest Research. 1996. Vol. 11, № 1-4. P. 242–250. <https://doi.org/10.1080/02827589609382933>
11. Malabadi R.B., van Staden J. Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices of mature trees of *Pinus patula* // Tree Physiology. 2005. Vol. 25, № 1. P. 11–16. <https://doi.org/10.1093/treephys/25.1.11>
12. Niskanen A.M., Lu J., Seitz S., Keinonen K., von Weissenberg K., Pappinen A. Effect of parent genotype on somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris*) // Tree Physiology. 2004. Vol. 24, № 11. P. 1259–1265. <https://doi.org/10.1093/treephys/24.11.1259>
13. Tret'yakova, I.N., Shuvaev D.N. Somatic embryogenesis in *Pinus pumila* and productivity of embryogenic lines during long-term cultivation *in vitro* // Russian Journal of Developmental Biology. 2015. Vol. 46, № 5. P. 276–285. <https://doi.org/10.1134/S1062360415050070>
14. Tret'yakova I.N., Park M.E. Collectible cell lines of *Larix sibirica* obtained by somatic embryogenesis and their ability to regenerate // Forests. 2023. Vol. 14, № 9. P. 1920. <https://doi.org/10.3390/f14091920>
15. Von Arnold S., Sabala I., Bozhkov P., Dyachok J., Filonova L. Developmental pathways of somatic embryogenesis // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2002. Vol. 69, № 3. P. 233–249. <https://doi.org/10.1023/A:1015673200621>