

УДК 615.322+58.085

БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ВЕГЕТАТИВНЫХ ЭКСПЛАНТОВ И КАЛЛУСОВ *PINUS SIBIRICA DU TOUR*

© Ж.А. Кох^{1,2*}, Ю.А. Литовка^{1,3}, П.В. Маколова¹, К.А. Шабанова³, И.Н. Павлов^{1,3}

¹ Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН,
Академгородок, 50/28, Красноярск, 660036 (Россия),
e-mail: jannetta-83@mail.ru

² Красноярский государственный аграрный университет, пр. Мира, 90,
Красноярск, 660049 (Россия)

³ Сибирский государственный университет науки и технологий имени
академика М.Ф. Решетнёва, пр. Мира, 82, Красноярск, 660049 (Россия)

Подобраны способы стерилизации однолетних побегов *Pinus sibirica DuTour* и условия культивирования при введении их в культуру *in vitro*. Индукция каллусогенеза асептически жизнеспособных эксплантов *P. sibirica* интенсивнее протекает на модифицированной среде Мурасиге-Скуга при гормональном обеспечении КИН в концентрации 0.4%, 6-БАП – 0.25% и пониженном содержании сахарозы – 1.5% с частотой каллусообразования 83%. Установлены близкие количественные показатели содержания экстрактивных веществ (36 и 33% от абсолютно сухой массы соответственно для каллуса и экспланта); легкогидролизуемых полисахаридов (18 и 16%) и белковых соединений (11 и 10%). Каллусы *P. sibirica* характеризуются более высоким содержанием аскорбиновой кислоты, флаваноидов, токоферолов и зольных элементов на фоне невысокого количества трудногидролизуемых полисахаридов, танинов, липидов, пигментов и эфирных масел. Электрофоретический спектр водорастворимых белков каллусной ткани представлен одиннадцатью фракциями: 63% от суммы водорастворимых белков составляют фракции с молекулярной массой 33 кД и выше; максимально представлены фракции с молекулярными массами 50 и 62 кД (20 и 17%). В эксплантах *P. sibirica* преобладают низкомолекулярные фракции белков с молекулярными массами от 5 кД и ниже (59%). Аминокислотный состав каллусов и эксплантов *P. sibirica* идентичен и представлен пятнадцатью индивидуальными аминокислотами. В каллусной ткани обнаружено более высокое содержание глутаминовой кислоты; достоверное увеличение содержания двух гидрофобных аминокислот (пролин и изолейцин) в период интенсивного каллусообразования проявляется на фоне уменьшения количества гидрофильной аминокислоты тирозин по сравнению с вегетативной частью растения.

Ключевые слова: *Pinus sibirica*, культивирование *in vitro*, стерилизация, каллусы, экспланты, биохимический состав, водорастворимые белки.

Введение

Накопление органической растительной массы в целом, и хвойными растениями в частности, приобретает особую значимость в современном мире, находящемся под угрозой истощения основных энергетических ресурсов. Хвойные растения имеют неопределимое экономическое значение как источник коммерческой древесины, сырья для изготовления бумаги, биологически активных веществ для различных отраслей промышленности, а также играют важную роль в поддержании экологического баланса планеты [1]. Представители семейства *Pinaceae* наряду с общими чертами, характерными для хвойных растений, обладают особенностями, которые обеспечили им широкое распространение в различных климатических зонах. На тер-

ритории Сибири одной их основных хозяйственно ценных древесных пород является *Pinus sibirica Du Tour*. Высокие технические качества ее древесины и широкое распространение обусловили многолетнюю масштабную эксплуатацию сосновых лесов и истощение естественных ресурсов.

Кох Жанна Александровна – кандидат технических наук, научный сотрудник, доцент кафедры технологии, оборудования бродильных и пищевых производств, тел. (391)247-26-66, e-mail: jannetta-83@mail.ru
Литовка Юлия Александровна – доктор биологических наук, старший научный сотрудник, профессор кафедры химической технологии древесины и биотехнологии, тел. (391) 227-36-54, e-mail: litovkajul@rambler.ru

Окончание на С. 396.

* Автор, с которым следует вести переписку.

В настоящее время практическое лесоводство направлено на интенсификацию процессов восстановления хвойных лесов с применением агротехнических приемов, ускоряющих рост и накопление биомассы, повышающих в целом продуктивность древесных насаждений [2]. Биотехнологические методы также находят широкое применение в лесном секторе для производства высококачественного посадочного материала и создания лесосырьевых плантаций, производства биологических средств защиты, создания новых форм древесных растений с заданными признаками. Одним из эффективных методов, направленных на ограничение деградации хвойных древостоев, поддержание и восполнение востребованных и редких представителей флоры, является клональное микроразмножение растений, включая соматический эмбриогенез [1–3]. Основными преимуществами этого метода являются высокий коэффициент размножения, увеличение сезонности и продуктивности, получение заданного количества посадочного материала с улучшенными наследственными свойствами, возможность размножить отдельные деревья с уникальным генотипом и поддерживать биоразнообразие, сохраняя редкие и исчезающие виды [4].

Работы по микроклональному размножению лиственных пород (*Betula*, *Castanea*, *Fraxinus*, *Populus*, *Quercus*, *Salix*) ведутся давно и достаточно успешно [5–9]. Хвойные растения являются более сложным объектом для культивирования *in vitro* за счет невысокой скорости роста и быстрой контаминации культуры, наличием фенольных соединений, ингибирующих рост и деление клеток, низкой укореняемостью. Одним из наиболее перспективных методов в микроклональном размножении пород деревьев (*Larix sibirica*, *L. gmelini*, *L. sukaczewii*, *Pinus sibirica*, *P. sylvestris*, *P. pumela*, *Picea abies*, *P. ajaensis*) считается соматический эмбриогенез, способный в дальнейшем обеспечить получение «искусственных семян» и существенно снизить стоимость посадочного материала [10–12]. Применение мегагаметофита, зрелых и незрелых зародышей, семядолей и гипокотыля в качестве исходных эксплантов обеспечивает высокие показатели морфогенеза, но не позволяет полностью воспроизвести генотип исходного растения. В связи с чем немалый интерес представляют исследования вегетативных частей растений (сегментов побегов и зрелой хвои) как первичных эксплантов для получения материала генетически идентичного исходной форме [13–17].

Культивирование растений *in vitro* сопровождается изменением цитофизиологических особенностей, биохимического состава и метаболической активности их клеток по сравнению с исходным растением. Сравнительное исследование основных групп биологически активных веществ каллусной ткани и интактного растения позволяет оценить метаболические изменения в клетках после их де-дифференциации и перспективность дальнейшего практического использования полученной каллусной культуры [17–20]. Успешное внедрение микроклональных методов в практику лесовосстановления невозможно без всестороннего исследования особенностей каллусогенеза хвойных растений на морфологическом, цитологическом и биохимическом уровнях, а разработка условий эффективного введения эксплантов в культуру, изучение биохимического состава каллусной ткани и растений-регенерантов является актуальной задачей.

Экспериментальная часть

Индукция морфогенеза в условиях *in vitro* зависит от подбора первичного экспланта, условий стерилизации растительного материала и питательной среды с оптимальным соотношением фитогормонов. Исходный материал получали от растений *P. sibirica*, произрастающих на территории Ермаковского района Красноярского края (Южная Сибирь). В качестве первичных эксплантов использовали сегменты однолетних побегов *P. sibirica* (средняя часть) размером 2 см. Стерилизацию эксплантов проводили в два этапа: 1. предобработка растительного материала путем погружения в 2% мыльный раствор в течение 2–10 мин с последующим промыванием в дистиллированной воде в течение 15 мин; 2. основная стерилизация эксплантов в условиях ламинар-бокса различными стерилизующими агентами (70% раствор C_2H_5OH ; 2.5% раствор $NaClO$; 0.2% раствор диацета) с последующим 3-кратным промыванием дистиллированной водой.

Маколова Полина Васильевна – младший научный сотрудник лаборатории лесных культур, микологии и фитопатологии, e-mail: polinotchka-makolova@rambler.ru

Шабанова Ксения Александровна – студент, e-mail: shabanova.ksenia@mail.ru

Павлов Игорь Николаевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией лесных культур, микологии и фитопатологии, заместитель директора по научной работе, заведующий кафедрой химической технологии древесины и биотехнологии, тел. (391) 227-36-54, e-mail: forester24@mail.ru

Каллусную ткань *P. sibirica* получали на базовой и модифицированной средах по прописи Мурасиге-Скуга (МС) (состав представлен в таблице 1) методом твердофазного культивирования. Гормональное обеспечение осуществляли, используя КИН (Sigma, США) – 0.1–0.4 мг/л; 6-БАП (Sigma,

США) – 0.25–0.5 мг/л. В качестве источника углеродного питания использовали сахарозу в концентрации (1.5–3%). Пробирки с эксплантами инкубировали в климатикамере («JeioTech», Корея) при следующих условиях: фотопериод – 16 ч; освещенность – 2–3 кЛк; температура – 24±1 °С; влажность воздуха – 70%; продолжительность – 21–28 сут. Частоту каллусообразования оценивали по количеству эксплантов, продуцирующих каллус, от их общего числа (%).

Каллусную ткань поддерживали в культуре путем ее регулярных пассажей на свежую питательную среду в оптимальных условиях культивирования. Для исследования химического состава использовали каллусы после пятой процедуры пассирования при суммарном накоплении сырой биомассы в количестве 100 г. Общее содержание белка в первичных эксплантах и каллусной ткани определяли по методу Бузуна [21]; фракционный состав и молекулярные массы водорастворимых белков – методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия по Орнштейну и Девидсу в современной модификации [22]; содержание свободных аминокислот – методом тонкослойной хроматографии [22]. Определение экстрактивных веществ проводили гравиметрическим методом (многократной экстракцией) [23, 24]; витаминов – по методикам Девяткина [18]; суммарного количества углеводов – по методике Вознесенского [23, 24]; лигнинных веществ – модифицированным методом Комарова с 72%-ной серной кислотой [24, 25]. Количество зольных веществ определяли спектрофотометрическим методом [23, 25]; содержание и состав липидов – по методикам Кейтс [26]; содержание эфирного масла – путем его перегонки с водяным паром с последующим измерением объема [23, 25]. Опыты проведены в 3-кратной повторности. Статистическая обработка данных проведена согласно общепринятым методам математической статистики при помощи стандартного пакета документов Microsoft Office Excel (2010). Статистическую значимость различий оценивали по t-критерию Стьюдента при $p < 0.05$. На графике представлены средние значения и их стандартные ошибки.

Таблица 1. Компонентный состав базовой и модифицированной сред Мурасиге-Скуга для введения в культуру вегетативных эксплантов *Pinussibirica*

Состав компонентов из базовой прописи, идентичный для обеих сред, мг/л	Компоненты, содержание которых различается	Содержание вещества, мг/л	
		базовый состав	модифицированный состав
KNO ₃ – 1900; NH ₄ NO ₃ – 1650; KH ₂ PO ₄ – 1700; MgSO ₄ × 7H ₂ O – 370; CaCl ₂ × 2H ₂ O – 690; Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O – 0.25; CuSO ₄ × 5H ₂ O – 0.025; H ₃ BO ₃ – 6.2; MnSO ₄ × 4H ₂ O – 22.3; ZnSO ₄ × 7H ₂ O – 8.6; KJ – 0.83; CoCl ₂ × 6H ₂ O – 0.025; FeSO ₄ × 7H ₂ O – 27.85; Na ₂ ЭДТА – 37.35; agar – 7000	Тиамин гидрохлорид	0.1	0.5
	Пиридоксин гидрохлорид	0.5	1.0
	Глицин	0.5	–
	Никотиновая кислота	0.5	1.0
	Инозитол	100	150
	КИН (кинетин)	–	0.1–0.4
	6-БАП (6-бензиламинопурин)	–	0.25–0.5
	Сахароза	30000	15000–30000

Обсуждение результатов

Введение в культуру *in vitro* вегетативных частей *P. sibirica* и накопления каллусной ткани проводили при строгом соблюдении всех этапов стерилизации и условий культивирования. Доля асептически жизнеспособных эксплантов варьировала в широких пределах от 36 до 87% в зависимости от используемого стерилизующего агента и времени экспозиции. Доля асептически нежизнеспособных эксплантов изменялась от 0 до 60%; уровень контаминации составил 4–51% (табл. 2). Наиболее приемлемым вариантом стерилизации первичных эксплантов *P. sibirica* является использование 0.2% раствора диацита в течение 2 мин с предварительной экспозицией растительной ткани в 2% мыльном растворе в течение 2 мин. При таком способе предобработки доля асептически жизнеспособных эксплантов составила 87%, нежизнеспособных – 3%; уровень контаминации – 10%.

Стерильные побеги *P. sibirica* вводили на агаризованные питательные среды с минеральным составом по базовому составу компонентов среды МС и модифицированную питательную среду с различными концентрациями регуляторов роста, а также стандартным и пониженным содержанием сахарозы. Образование каллусной ткани отмечено только на средах с присутствием 6-БАП и КИН, что позволяет отнести культуру *P. sibirica* к ауксинозависимой. Максимальная частота каллусообразования 82.7% отмечена на модифицированной среде МС при гормональном обеспечении КИН в концентрации 0.4%; 6-БАП – 0.25% и пониженном содержании сахарозы – 1.5%. Ростовый цикл каллусных клеток *P. sibirica* начинался с размещения экспланта

на питательной среде МС (начало культивирования) и завершился в момент прекращения митоза (стационарная фаза). Общая продолжительность активного периода роста каллуса без потери жизнеспособности составила 21–28 сут. Для поддержания культуры каллусную ткань пассировали на свежую питательную среду в объеме 60–100 мг на 20–40 мл среды с периодичностью 4–6 недель. Отмечено формирование рыхлой и компактной ткани зеленого цвета (рис. 1); в большинстве случаев для субкультуры отбирали компактную ткань, так как культивирование рыхлой каллусной ткани способствовало только ризогенезу.

Сравнительное исследование биохимического состава растительной ткани проводили между первичными эксплантами и каллусами *P. sibirica* после пятой процедуры пассирования (при суммарном накоплении сырой биомассы 100 г). Содержание (% от абсолютной сухой массы) исследуемых компонентов представлено в таблице 3. Установлено, что все исследуемые компоненты группового состава присутствовали в каллусной культуре и интактном растении, однако их содержание в большинстве случаев существенно различалось. В двух типах растительных образцов близкие показатели по количественному содержанию выявлены для экстрактивных веществ – 36 и 33% соответственно для каллуса и первичного экспланта; легкогидролизуемых полисахаридов – 18 и 16% и белковых соединений – 11 и 10%. В каллусной ткани значительно ниже содержание трудногидролизуемых полисахаридов (в 2.9 раз); водорастворимых веществ (в 3.1 раза), включая танины (в 21.3 раза); липидов (в 10.6 раза), в том числе фосфолипидов (в 4 раза) и восков (в 11.3 раза); пигментов хлорофиллов (в 3.6 раза) и каротиноидов (в 3 раза) и особенно эфирных масел. Каллусная культура *P. sibirica* характеризуется более высоким содержанием витаминов – аскорбиновой кислоты (3.3 мг%), флавоноидов (2.5 мг%) и токоферолов (0.4 мг%), а также зольных элементов (соответственно в 2.5; 6.3; 10 и 1.5 раза больше по сравнению с вегетативными эксплантами).

Таблица 2. Эффективность стерилизации вегетативных эксплантов *Pinus sibirica*

Предобработка	Основная стерилизация		Соотношение эксплантов, %		
	Стерилизующий агент и его концентрация	Длительность экспозиции, мин	асептически жизнеспособные	асептически нежизнеспособные	инфицированные
Время стерилизации в 2% мыльном растворе, мин	70% C ₂ H ₅ OH	2	64	0	36
			67	7	26
			69	20	11
2	2.5% NaClO	15	39	10	51
			57	12	31
			65	25	10
2	0.2% диацид	2	87	3	10
			42	37	21
			36	60	4

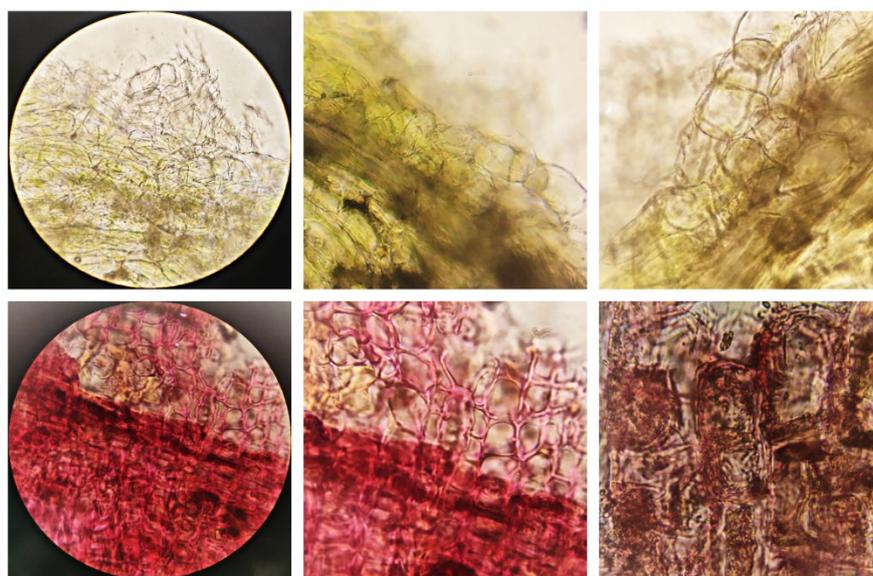


Рис. 1. Морфология клеток компактной каллусной культуры *Pinus sibirica* без окрашивания (вверху) и с применением сафранина (внизу), $\times 1000$ – 2000

Каллусная культура *P. sibirica* в сравнении с химическим составом каллусов другого хвойного растения (*Juniperus sibirica* L.) характеризуется идентичным содержанием экстрактивных и зольных веществ, но существенно отличается по лигноцеллюлозной и белковой составляющей. Количество легкогидролизуемых полисахаридов и белковых веществ в каллусной культуре *P. sibirica* выше в 1.4 и 1.5 раз соответственно; трудногидролизуемых полисахаридов и лигниновых веществ – ниже в 3.3 и 3.9 раза по сравнению с каллусной культурой *J.sibirica* [27].

Количественное содержание белковых соединений в каллусах и эксплантах *P. sibirica* различалось несущественно, в связи с чем были дополнительно исследованы некоторые качественные характеристики водорастворимых белков и свободных аминокислот. Использование метода электрофореза в полиакриламидном геле позволило разделить белки, выделенные из вегетативной части экспланта и каллусной ткани, на одиннадцать фракций. Результаты электрофоретического исследования и определения молекулярных масс водорастворимых белков приведены в таблице 4.

Полученные данные свидетельствуют, что в интактном растении преобладают низкомолекулярные фракции белков с молекулярными массами от 5 кД и ниже – их доля составляет 59.4% от суммы водорастворимых белков. Максимально представлены фракции с молекулярными массами 5 кД (35%) и 2 кД (18%); в меньшей степени – три фракции с молекулярными массами от 16 до 50 кД (13–14%). Белки с молекулярной массой более 50 кД представлены незначительно – около 9%. Электрофоретический спектр водорастворимых белков каллусной ткани *P. sibirica* также представлен одиннадцатью фракциями, однако их соотношение существенно отличается. Содержание фракций с молекулярной массой 33 кД и выше составляет 63% от суммы водорастворимых белков. Максимально представлены две фракции с молекулярными массами 50 и 62 кД – соответственно 20 и 17%; в меньшей степени – три фракции с молекулярными массами 82, 33 и 16 кД (12–14%). В низкомолекулярной области спектра содержание отдельных фракций варьирует в пределах от 3 до 9%.

Таблица 3. Биохимический состав каллусной ткани и первичных эксплатов *Pinus sibirica*

Показатель	Содержание компонентов, % от а.с.м.	
	каллусы	экспланты
Экстрактивные вещества	36.1	33.2
Легкогидролизуемые полисахариды	17.5	15.7
Трудногидролизуемые полисахариды	7.3	21.2
Белковые вещества	11.3	10.4
Растворимые в воде вещества, в т.ч.:	7.5	23.4
- редуцирующие вещества	4.1	6.9
- танины	0.4	8.5
Лигнин	5.7	24.9
Аскорбиновая кислота (витамин С), мг%	3.3	1.3
Флавоноиды (витамин Р), мг%	2.5	0.4
Токоферолы (витамин Е), мг%	0.4	0.04
Липиды	0.8	8.5
- фосфолипиды	0.3	1.2
Воска	0.3	3.4
Хлорофиллы, мг%	0.5	1.8
Каратиноды, мг%	0.01	0.03
Эфирное масло	0.02	2.9
Зольные элементы	4.2	2.8

Таблица 4. Фракционный состав водорастворимых белков в каллусной ткани и эксплантах *Pinus sibirica*

Фракция	Rf (шкала электрофоретической подвижности белков)	Молекулярная масса, кД	Содержание, % к сумме водорастворимых белков	
			каллусы	экспланты
1	0.25	82	12.3	2.9
2	0.29	62	16.7	6.3
3	0.34	50	19.5	13.7
4	0.41	33	14.3	12.9
5	0.53	16	12.3	14.2
6	0.59	10	8.7	7.1
7	0.63	8	3.6	1.2
8	0.67	5	3.4	34.7
9	0.69	4	6.5	4.2
10	0.76	3.5	6.3	2.4
11	0.90	2	7.9	18.1

Аминокислотный состав первичных эксплантов и каллусов *P. sibirica* идентичен и представлен пятнадцатью индивидуальными аминокислотами (рис. 2). Количественный анализ не выявил статистически значимых различий между содержанием большинства идентифицированных аминокислот в исследуемых растительных тканях, за исключением тирозина (содержание в 1.6 раза выше в экспланте), а также изолейцина и пролина (содержание выше в каллусной ткани в 1.9 раза).

В каллусной ткани *P. sibirica* обнаружено более высокое содержание глутаминовой кислоты – 702 мкг/г (в экспланте 655 мкг/г), которая играет ключевую роль в аминокислотном обмене, в том числе во время активной стадии каллусогенеза. Глутаминовая кислота является донором аминогруппы в реакциях трансминирования α -кетокислот, которые считаются одним из основных биохимических путей введения α -аминогруппы при биосинтезе других аминокислот. В каллусах и эксплантах *P. sibirica* также выявлено значительное количество аспарагиновой кислоты (464 и 445 мкг/г соответственно). Активный биосинтез глутаминовой и аспарагиновой кислот свидетельствует о высокой активности азотного метаболизма в исследуемых растительных тканях и предотвращает накопление в них избыточных концентраций аммиака. В меньшей степени в каллусе и интактном растении представлены аминокислоты гистидин, аланин, глицин, фенилаланин, лейцин, лизин, валин, а также изолейцин (в эксплантах) – содержание их находится в пределах от 203 до 301 мкг/г; присутствие остальных аминокислот было менее значимым – от 105 до 199 мкг/г. В целом, аминокислотный состав отличается незначительно: увеличение содержания двух гидрофобных аминокислот (пролин и изолейцин) в период интенсивного каллусообразования *P. sibirica* проявляется на фоне уменьшения количества гидрофильной аминокислоты тирозин по сравнению с вегетативной частью растения.

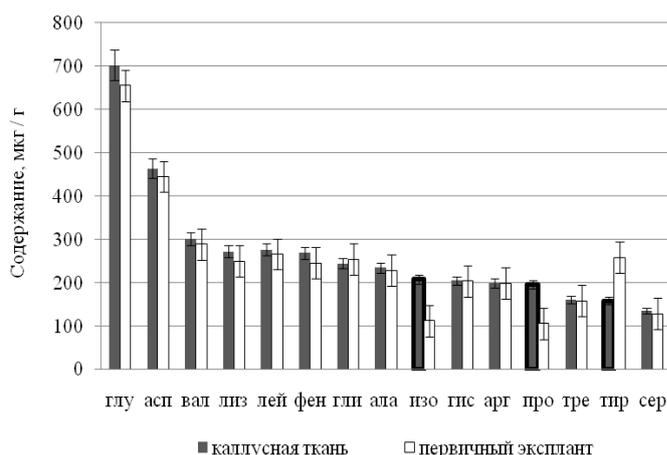


Рис. 2. Аминокислотный состав в каллусной ткани и первичных эксплантах *Pinus sibirica*

Выводы

Оптимальным способом стерилизации вегетативных частей *P. sibirica* при введении их в культуру *in vitro* является обработка первичных эксплантов в 0.2% растворе диацета в течение 2 мин с предварительной экспозицией растительной ткани в 2% мыльном растворе в течение 2 мин. Доля асептически жизнеспособных эксплантов составила 87%, нежизнеспособных – 3%; уровень контаминации – 10%. Индукция каллусогенеза первичных эксплантов *P. sibirica* интенсивнее протекает на модифицированной среде Мурасиге-Скуга при гормональном обеспечении КИН в концентрации 0.4%, 6-БАП – 0.25% и пониженном содержании сахарозы – 1.5% с частотой каллусообразования 82.7%.

Биохимическое исследование двух типов растительных тканей выявило близкие показатели по количественному содержанию экстрактивных веществ (36 и 33% соответственно для каллуса и первичного экспланта); легкогидролизуемых полисахаридов (18 и 16%) и белковых соединений (11 и 10%). В каллусной ткани значительно ниже содержание трудногидролизуемых полисахаридов, водорастворимых веществ, липидов, пигментов и эфирных масел. Каллусы *P. sibirica* характеризуется более высоким содержанием аскорбиновой кислоты, флаваноидов, токоферолов и зольных элементов по сравнению с интактным растением.

Электрофоретический спектр водорастворимых белков каллусной ткани *P. sibirica* представлен одиннадцатью фракциями, соотношение которых существенно отличается от эксплантов. Содержание фракций с молекулярной массой 33 кД и выше составляет 63% от суммы водорастворимых белков; максимально

представлены две фракции с молекулярными массами 50 и 62 кД (20 и 17% соответственно). В низкомолекулярной области спектра содержание отдельных фракций варьирует в пределах от 3 до 9%. В вегетативных эксплантах преобладают низкомолекулярные фракции белков с молекулярными массами от 5 кД и ниже – их доля составляет 59% от суммы водорастворимых белков.

Аминокислотный состав каллусов и эксплантов *P. sibirica* идентичен и представлен пятнадцатью индивидуальными аминокислотами. В каллусной ткани обнаружено более высокое содержание глутаминовой кислоты; достоверное увеличение содержания гидрофобных аминокислот пролина и изолейцина (в 1.9 раза) в период интенсивного каллусообразования проявляется на фоне уменьшения количества гидрофильной аминокислоты тирозин по сравнению с вегетативной частью растения.

Список литературы

1. Жигунов А.В. Применение биотехнологий в лесном хозяйстве России // Лесной журнал. 2013. №2. С. 27–35.
2. Третьякова И.Н., Ворошилова Е.В., Шуваев Д.Н., Пак М.Э. Перспективы микрклонального размножения хвойных в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез // Хвойные бореальной зоны. 2012. Т. 30. №1–2. С. 180–186.
3. Бабикова А.В., Гафицкая И.В., Журавлев Ю.Н. Микрклональное размножение древесных лесных растений Дальнего Востока России: перспективы развития // Размножение лесных растений в культуре *in vitro* как основа плантационного лесовыращивания: материалы Международной научно-практической конференции. 2014. С. 4–8.
4. Красноперова В.В., Власевский Д.Н. Роль вегетативного размножения хвойных растений в культуре *in vitro* для нужд лесного и садово-паркового хозяйства // Пермский аграрный вестник. 2017. №4. С. 18–22.
5. Машкина О.С., Табацкая Т.М., Исаков Ю.Н. Клональное размножение березы карельской // Лесное хозяйство. 2000. №4. С. 33–34.
6. Машкина О.С., Табацкая Т.М., Горобец А.И., Шестибратов К.А. Методы клонального микроразмножения различных видов и гибридов ивы // Биотехнология. 2010. №1. С. 51–59.
7. Машкина О.С., Табацкая Т.М., Стародубцева Л.М. Длительное микрочеренкование для массового клонального размножения карельской березы и тополя // Физиология растений. 1999. Т. 46. №6. С. 950–952.
8. Жигунов А.В. Рост триплоидной осины в лесных культурах, созданных посадочным материалом, полученным по технологии *in vitro* // Труды СПбНИИЛХ. 2009. №1(18). С. 143–152.
9. Шабунин Д.А. Перспективы микрклонального размножения лиственных пород для плантационного лесовыращивания // Труды СПбНИИЛХ. 2011. Ч. 1. №1(24). С. 49–55.
10. Божков П.В. Соматический эмбриогенез и полиэмбриогенез хвойных *in vitro* на примере ели обыкновенной (*Picea abies* L. Karst): автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 1994. 20 с.
11. Лебедев В.Г., Шестибратов К.А. Органогенез сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в культуре *in vitro* // Хвойные бореальной зоны. 2012. №1–2. С. 114–119.
12. Sarvas R. Investigations on the flowering and seed crop of *Pinus sylvestris* // Comm. Inst. For. Fenniae. 1962. Vol. 53. Pp. 1–198. DOI: 10.1016/0378-1127(87)90009-0.
13. Третьякова А.В., Демина Е.А., Рекославская Н.И., Саляев Р.К., Столбиков А.С. Особенности получения каллусной культуры пихты сибирской *Abies sibirica* Ledeb. // Известия ИГУ. 2014. Т. 10. С. 11–23.
14. Brodelius P., Pedersen H. Increasing secondary metabolic production in plant cell culture by redirecting transport // Trends in Biotechnology. 1993. Vol. 11. N1. Pp. 30–36.
15. Murashige T.A., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. N4. Pp. 473–497.
16. Koski V. Generative reproduction and genetic processes in nature // Genetics of Scots Pine. Amsterdam: Elsevier, 1991. Pp. 59–72.
17. Tretyakova I.N., Park M.E., Kazachenko A.S., Shuklina A.S., Kudoyarova G.R., Akhiyarova G.R., Korobova A.V., Veselov S.U. Content and immunohistochemical localization of hormones during *in vitro* somatic embryogenesis in long-term proliferating *Larix sibirica* cultures // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2019. Vol. 136. N3. Pp. 511–522. DOI: 10.1007/s11240-018-01533-y.
18. Stasolla C., Yeung E. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2003. Vol. 74. Pp. 15–35. DOI: 10.1023/A:1023345803336.
19. Park Y.'S., Bonga J. Application of somatic embryogenesis in forest // Management and research IUFRO working party 2.09.02 somatic embryogenesis of forest trees conference advances in somatic embryogenesis of trees and its application for the future forests and plantations. Su-won, Republic of Korea, 2010. Pp. 3–8.
20. Klimaszewska K., Park Y.-S., Overton C. et al. Optimized somatic embryogenesis in *Pinus strobus* L. // *In vitro* Cell. Dev. Biol.-Plant. 2001. Vol. 37. Pp. 392–399. DOI: 10.1007/s11627-001-0069-z.
21. Бузун Г.А., Джемухадзе К.М., Милешко Л.Ф. Определение белка в растениях с помощью амидо-черного // Физиология растений. 1982. Т. 29. №1. С. 198–203.
22. Ермаков А.Е., Арасимович В.В., Ярош Н.П. Методы биохимического исследования растений. Л., 1988. 430 с.

23. ГОСТ 24027.2-80. Сырье лекарственное растительное. Методы определения влажности, содержание золы, экстрактивных и дубильных веществ, эфирных масел. Лекарственное растительное сырье. М., 1980. С. 284–294.
24. Ушанова В.М., Лебедева О.И., Девятловская А.Н. Основы научных исследований: учеб. пособие. Красноярск, 2004. Т. 3. 359 с.
25. Оболенская А.В., Ельницкая З.П., Леонович А.А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы: учеб. пособие для вузов. М., 1991. 320 с.
26. Кейтс М. Техника липидологии. М., 1975. 322 с.
27. Зырянова Ю.В., Аёшина Е.Н., Величко Н.А. Химический состав можжевельника сибирского, каллусной ткани и послеэкстракционного остатка // Химия растительного сырья. 2012. №2. С. 145–150.

Поступила в редакцию 29 сентября 2020 г.

Принята к публикации 13 ноября 2020 г.

Для цитирования: Кох Ж.А., Литовка Ю.А., Маколова П.В., Шабанова К.А., Павлов И.Н. Биохимический состав вегетативных эксплантов и каллусов *Pinus sibirica* Du Tour // Химия растительного сырья. 2020. №4. С. 395–403. DOI: 10.14258/jcprm.2020048530.

Koh Zh.A.^{1,2}, Litovka Yu.A.^{1,3}, Makolova P.V.¹, Shabanova K.A.³, Pavlov I.N.^{1,3}* BIOCHEMICAL COMPOSITION OF VEGETATIVE EXPLANTS AND CALLUS *PINUS SIBIRICA* DU TOUR

¹ *Institute of Forest named after V.N. Sukachev SB RAS, FRC KSC SB RAS, Akademgorodok, 50/28, Krasnoyarsk, 660036 (Russia), e-mail: jannetta-83@mail.ru*

² *Krasnoyarsk State Agrarian University, pr. Mira, 90, Krasnoyarsk, 660049 (Russia)*

³ *Siberian State University of Science and Technology named after academician M.F. Reshetneva, pr. Mira, 82, Krasnoyarsk, 660049 (Russia)*

The methods of sterilization of annual shoots *Pinus sibirica* Du Tour and the conditions for their introduction into in vitro culture were studied. Induction of callusogenesis of aseptically viable explants of *P. sibirica* proceeds more intensively on the modified Murasige-Skoog medium: hormonal supply of 0.4% kinetin and 0.25% 6-benzylaminopurine; reduced sucrose concentration of 1.5%. The frequency of callus formation was 83%.

Close quantitative indicators of extractive substances were established (36 and 33% of absolutely dry weight for callus and explant, respectively); easily hydrolyzable polysaccharides (18 and 16%) and proteins (11 and 10%). Callus *P. sibirica* has a higher content of ascorbic acid, flavanoids, tocopherols and ash elements compared to explants and a low amount of hard-hydrolyzable polysaccharides, lipids, tannins, pigments, and essential oils. The electrophoretic spectrum of water-soluble callus proteins is represented by eleven fractions: 63% of the total water-soluble proteins are fractions with a molecular weight of 33 kD and above. Fractions with molecular weights of 50 and 62 kD (20 and 17%, respectively) are represented as much as possible. In the explants of *P. sibirica*, low molecular weight fractions of proteins with molecular masses of 5 kD and lower (59%) predominate. The amino acid composition of calli and explants of *P. sibirica* is identical and is represented by fifteen individual amino acids. Callus tissue has a higher content of glutamic acid and two hydrophobic amino acids (proline and isoleucine) compared to the vegetative part of the plant and low tyrosine content.

Keywords: *Pinus sibirica*, in vitro cultivation, sterilization, callus, explants, biochemical composition, water-soluble proteins.

* Corresponding author.

References

1. Zhigunov A.V. *Lesnoy zhurnal*, 2013, no. 2, pp. 27–35. (in Russ.).
2. Tret'yakova I.N., Voroshilova Ye.V., Shuvayev D.N., Pak M.E. *Khvoynnye boreal'noy zony*, 2012, vol. 30, no. 1–2, pp. 180–186. (in Russ.).
3. Babikova A.V., Gafitskaya I.V., Zhuravlev Yu.N. *Razmnozheniye lesnykh rasteniy v kul'ture invitro kak osno-va plantatsionnogo lesovyrashchivaniya. Materialy mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii*. [Reproduction of forest plants in in vitro culture as the basis for plantation forest growing. Materials of the international scientific and practical conference]. 2014, pp. 4–8. (in Russ.).
4. Krasnoperova V.V., Vlasevskiy D.N. *Permskiy agrarnyy vestnik*, 2017, no. 4, pp. 18–22. (in Russ.).
5. Mashkina O.S., Tabatskaya T.M., Isakov Yu.N. *Lesnoye khozyaystvo*, 2000, no. 4, pp. 33–34. (in Russ.).
6. Mashkina O.S., Tabatskaya T.M., Gorobets A.I., Shestibratov K.A. *Biotekhnologiya*, 2010, no. 1, pp. 51–59. (in Russ.).
7. Mashkina O.S., Tabatskaya T.M., Starodubtseva L.M. *Fiziologiya rasteniy*, 1999, vol. 46, no. 6, pp. 950–952. (in Russ.).
8. Zhigunov A.V. *Trudy SPbNILKh*, 2009, no. 1(18), pp. 143–152. (in Russ.).
9. Shabunin D.A. *Trudy SPbNILKh*, 2011, no. 1(24), pp. 49–55. (in Russ.).
10. Bozhkov P.V. *Somaticheskyy embriogenez i poliembriogenez khvoynnykh invitro na primere yeli obyknovennoy (Piceaabies L. Karst): avtoref. dis. ... kand. biol. nauk*. [Somatic embryogenesis and polyembryogenesis of conifers in vitro on the example of Norway spruce (*Piceaabies L. Karst*): author. dis. ... Cand. biol. sciences]. St. Petersburg, 1994, 20 p. (in Russ.).
11. Lebedev V.G., Shestibratov K.A. *Khvoynnye boreal'noy zony*, 2012, no. 1–2, pp. 114–119. (in Russ.).
12. Sarvas R. *Comm. Inst. For. Fenniae*, 1962, vol. 53, pp. 1–198. DOI: 10.1016/0378-1127(87)90009-0.
13. Tret'yakova A.V., Demina Ye.A., Rekoslavskaya N.I., Salyayev R.K., Stolbikov A.S. *Izvestiya IGU*, 2014, vol. 10, pp. 11–23. (in Russ.).
14. Brodelius P., Pedersen H. *Trends in Biotechnology*, 1993, vol. 11, no. 1, pp. 30–36.
15. Murashige T.A., Skoog F. *Physiol. Plant*, 1962, vol. 15, no. 4, pp. 473–497.
16. Koski V. *Genetics of Scots Pine*, Amsterdam: Elsevier, 1991, pp. 59–72.
17. Tret'yakova I.N., Park M.E., Kazachenko A.S., Shuklina A.S., Kudoyarova G.R., Akhiyarova G.R., Korobova A.V., Veselov S.U. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2019, vol. 136, no. 3, pp. 511–522. DOI: 10.1007/s11240-018-01533-y.
18. Stasolla C., Yeung E. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, vol. 74, pp. 15–35. DOI: 10.1023/A:1023345803336.
19. Park Y.S., Bonga J. *Management and research IUFRO working party 2.09.02 somatic embryogenesis of forest trees conference advances in somatic embryogenesis of trees and its application for the future forests and plantations*, Suwon, Republic of Korea, 2010, pp. 3–8.
20. Klimaszewska K., Park Y-S., Overton C. et al. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 2001, vol. 37, pp. 392–399. DOI: 10.1007/s11627-001-0069-z.
21. Buzun G.A., Dzhemukhadze K.M., Milesheko L.F. *Fiziologiya rasteniy*, 1982, vol. 29, no. 1, pp. 198–203. (in Russ.).
22. Yermakov A.Ye., Arasimovich V.V., Yarosh N.P. *Metody biokhimicheskogo issledovaniya rasteniy*. [Biochemical research methods of plants]. Leningrad, 1988, 430 p. (in Russ.).
23. *GOST 24027.2-80. Syr'ye lekarstvennoye rastitel'noye. Metody opredeleniya vlazhnosti, sodержaniye zoly, ekstraktivnykh i dubil'nykh veshchestv, efirnykh masel. Lekarstvennoye rastitel'noye syr'ye*. [GOST 24027.2-80. Herbal medicinal raw materials. Methods for determining moisture content, ash content, extractive and tannins, essential oils. Medicinal herbal raw materials]. Moscow, 1980, pp. 284–294. (in Russ.).
24. Ushanova V.M., Lebedeva O.I., Devyatlovskaya A.N. *Osnovy nauchnykh issledovaniy: ucheb. posobiye*. [Fundamentals of scientific research: textbook. allowance]. Krasnoyarsk, 2004, vol. 3, 359 p. (in Russ.).
25. Obolenskaya A.V., Yel'nitskaya Z.P., Leonovich A.A. *Laboratornyye raboty po khimii drevesiny i tsellyulozy: ucheb. posobiye dlya vuzov*. [Laboratory work on the chemistry of wood and cellulose: textbook. manual for universities]. Moscow, 1991, 320 p. (in Russ.).
26. Keyts M. *Tekhnika lipidologii*. [Technique of lipidology]. Moscow, 1975, 322 p. (in Russ.).
27. Zyryanova Yu.V., Ayoshina E.N., Velichko N.A. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2012, no. 2, pp. 145–150. (in Russ.).

Received September 29, 2020

Accepted November 13, 2020

For citing: Koh Zh.A., Litovka Yu.A., Makolova P.V., Shabanova K.A., Pavlov I.N. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2020, no. 4, pp. 395–403. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcpr.2020048530.

