

СОЧЕТАНИЕ КЛАССИЧЕСКОЙ СЕЛЕКЦИИ И ПРИМЕНЕНИЯ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ ГЕНОФОНДА ХВОЙНЫХ ВИДОВ СИБИРИ

И.Н. ТРЕТЬЯКОВА, *доктор биологических наук;*

А.В. БАРСУКОВА; С.С. САВЕЛЬЕВ; А.С. СИРЕНКО

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Красноярск, Россия

Введение

Проблема сохранения генофонда основных лесообразующих 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 клonalного размножения. Этот эффективный метод регенерации растений позволяет сохранять генетические ресурсы на протяжении длительного времени благодаря высокой продуктивности пролиферирующей эмбриональной массы (ЭМ) и ее способности подвергаться длительной криоконсервации [7]. С помощью соматического эмбриогенеза можно производить массовое тиражирование высокопродуктивных, устойчивых к патогенам чистых линий растений для создания лесосеменных плантаций [3-5].

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 цитогистологического статуса морфогенных (эмбриональной массы) и неморфогенных 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 [1, 2]. Кроме того, критическим моментом является процесс вызревания соматических зародышей, поскольку он влияет на жизнеспособность полученных зародышей и их способность прорастать.

Сочетание селекционной стратегии размножения для улучшения хвойных видов – внутривидовой и межвидовой гибридизации – основано на использовании комплементарных признаков между родительскими генотипами, приводящими к гетерозису. При этом 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 – проведение работ по гибридизации основных лесообразующих видов Сибири с выявлением у них эффекта гетерозиса, а также разработка биотехнологии получения соматических зародышей и регенерантов у гибридных семян хвойных пород.

Объекты 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 проводили опыты по контролируемому опылению с использованием в качестве опылителей плюсовых деревьев (№ 107, 108, 277,

357, 492) и уникальных гетерозисных форм с однолетним развитием женской шишки (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) пыльцой 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 вводили в культуру *in vitro*. В опытах по гибридизации проводили тестирование пыльцы на жизнеспособность.

При проведении работ по индукции соматического эмбриогенеза семена стерилизовали и из них извлекали зародыши, которые вводили в культуру *in vitro*. Для инициации образования эмбриогенного каллуса (ЭК) из зиготических зародышей использовали базовые среды $\frac{1}{2}$ MS, MS [6], $\frac{1}{2}$ LV, LV, MSG [8] и MA (неопубликованные данные) с добавлением мезоинозита, L-глютамина, регуляторов роста (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 каждого вида по-разному). Эксперименты по индукции образования и пролиферации ЭК проводили в темноте при температуре $24\pm1^{\circ}\text{C}$. Для созревания соматических зародышей в среды добавляли АБК, ИМК, сахароза, а также Gelrite. Культивирование эксплантов проводили при 16-часовом фотопериоде и температуре $24\pm1^{\circ}\text{C}$.

Для цитологического анализа использовали давленые препараты. Окраску эксплантов проводили сафранином с добавлением капли метиленового синего. Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам при помощи Microsoft Excel. Морфологические изменения фиксировали цифровой фотокамерой Fujifilm FinePix S7000.

Результаты и обсуждение

Результаты проведенных исследований показали, что женские шишки появились на клонах кедра сибирского уже в 10-летнем возрасте (2001 г.), мужские шишки в 13-летнем возрасте (2006 г.). В этот период клоны достигали высоты 1,5-1,6 м, D_{1,3} (диаметр на высоте 1,3 м) составил 15-17 см. Прорастание *in vitro* пыльцы у плюсовых и гетерозисных деревьев, используемых в качестве опылителей, было достаточно высоким. У разных деревьев жизнеспособность пыльцы колебалась от 75,4 до 96,8%, средняя длина пыльцевых трубок – от 105 до 164,9 мкм, что свидетельствует о высоком качестве пыльцы.

Семенная продуктивность гибридных шишек клоновых деревьев сосны сибирской в разных вариантах контролируемого опыления колебалась от 47 до 98,7%. Полнозернистость семян составила 90-93%. Зародыши достигали длины 1/4-1/2 длины зародышевого канала. У клонов, обработанных пыльцой гетерозисного дерева с однолетним развитием женских шишек, 30% гибридных шишек развивались по однолетнему циклу. Однако размеры таких шишек оказались мельче (длина шишек составила 46 против 76 мм, ширина – 36 против 66 мм). Семенная продуктивность составила 57%. У однолетних шишек данного клона в семяпочках формировались архегонии.

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 образования ЭК, пролиферации эмбрионально-сuspensorной массы (ЭСМ), 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 сутки культивирования начинали интенсивно растягиваться в длину и превращаться в эмбриональные трубы размером 200-300 мкм (рис. 1 а). Эмбриональные трубы 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 (рис. 1 б). При пересадке ЭСМ на пролиферирующие среды с пониженным содержанием цитокининов и сахарозы, вызывающих интенсивную пролиферацию, шел активный кливаж. При субкультивировании ЭСМ на базовых средах, содержащих АБК и ИМК, соматические зародыши приобретали bipolarную структуру: на одном из полюсов формировались примордии семядолей, на другом – зародышевый корешок (рис. 1 в, г).

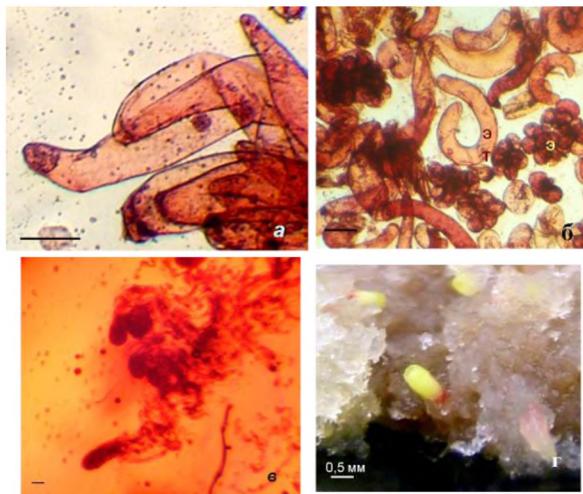


Рис. 1. Соматический эмбриогенез у лиственницы сибирской: а – индукция образования эмбриональной массы; б – пролиферация эмбриональной массы; в – соматические зародыши в эмбриональной массе; г – созревание соматических зародышей

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). Наиболее активное образование ЭК шло у клонов в вариантах опыления пыльцой гетерозисного дерева с однолетним формированием женских шишек (рис. 3). Динамика роста ЭК и образование соматических зародышей у лиственницы сибирской происходило аналогично кедру сибирскому.

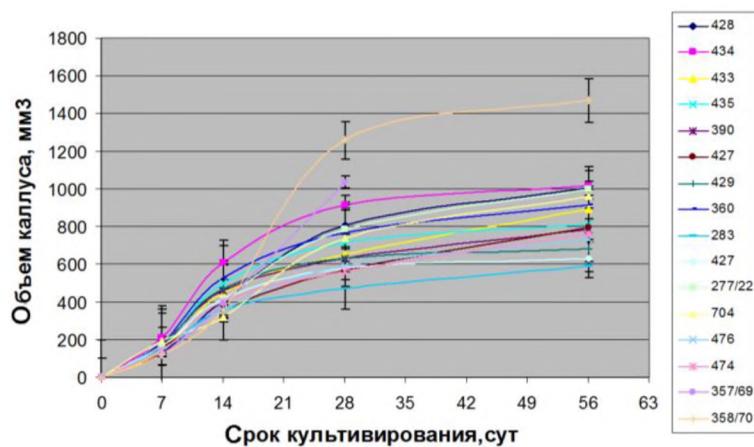


Рис. 2. Рост эмбриогенного каллуса у плюсовых деревьев кедра сибирского (цифрами обозначены номера деревьев)

Среди 30 генотипов лиственницы выделились 18% генотипов, у которых шло интенсивное образование эмбриогенного каллуса, у 57% генотипов образование эмбриогенного каллуса шло значительно слабее, а у 13% генотипов формирование эмбриогенного каллуса вообще не наблюдали. Особенно заслуживает внимание генотип донора лиственницы сибирской, который отличался устойчивостью к повреждению лиственничной почковой галлицей, и у которого шло активное формирование

эмбриогенного каллуса. За 50 суток культивирования объем ЭК достигал 18990 мм³. На 1 мм² ЭСМ насчитывалось в среднем 75±4,6 шт. эмбриональных глобул. У данного генотипа отмечали активное образование соматических зародышей. На среде для созревания насчитывалось до 380 шт. зародышей на 1 г эмбриогенного каллуса. Происходило формирование чистой эмбриогенной линии.

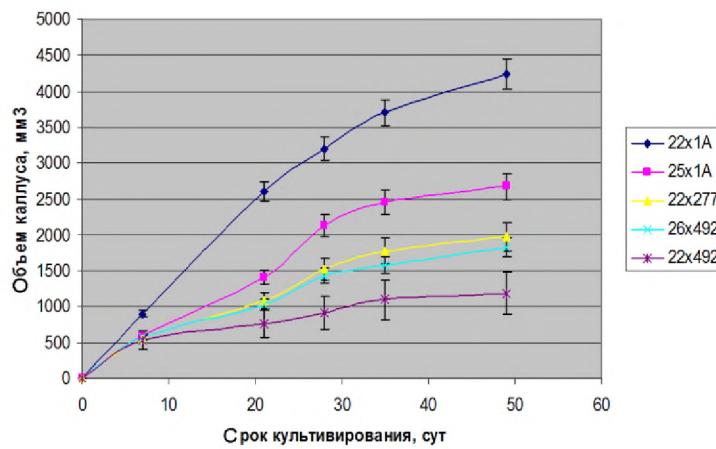


Рис. 3. Рост эмбриогенного каллуса у гибридных зародышей семян, полученных в результате контролируемого опыления клонов пыльцой плюсовых деревьев (22x492, 22x277, 26x492) и гетерозисного дерева кедра сибирского (22x1A, 25x1A)

Образование ЭК, его пролиферация, формирование и вызревание соматических зародышей у лиственницы сибирской занимало 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, и, наконец, происходит прорастание соматических зародышей. Реализация соматического процесса требует применения разных химических соединений, в том числе регуляторов роста и различных физических предобработок. Поэтому соматический эмбриогенез у хвойных видов можно использовать как модельную систему в эмбриологических исследованиях. С помощью эмбриогенных культур были получены генетически улучшенные растения, которые будут подвергнуты криоконсервации, что позволит создать банк улучшенных генотипов.

Выводы

1. В результате опытов по гибридизации кедра сибирского на клоновой прививочной плантации были получены шишки первого поколения с высокой semenной продуктивностью.
2. Из введенных изолированных зародышей кедра сибирского и лиственницы сибирской путем подбора состава питательных сред формировались эмбрионально-супензорная масса, соматические зародыши и регенеранты.
3. Наиболее активным ростом обладали эмбриогенные каллусы кедра сибирского, полученные от гетерозисных деревьев-опылителей с однолетним циклом развития женских шишечек и лиственницы сибирской, полученные от дерева, устойчивого к лиственничной почковой галлице. Определены генотипы донорных растений лиственницы сибирской и кедра сибирского, способные давать чистые эмбриогенные линии, соматические зародыши и регенеранты.

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

Список литературы

1. Белоруссова А.С., Третьякова И.Н. Особенности формирования соматических зародышей у лиственницы сибирской: эмбриологические аспекты // Онтогенез. – 2008. – Т. 39, № 2. – С. 1-10.
2. Перспективы применения методов биотехнологии для размножения генетически ценных форм лесных древесных видов / Третьякова И.Н., Белоруссова А.С., Носкова Н.Е., Савельев С.С., Лукина А.В., Барсукова А.В., Ижболдина М.В., Череповский Ю.А. // Хвойные boreальной зоны. – 2007. – Т. 24, № 2-3. – С. 309-318.
3. Klimaszewska K., Cyr D. R. Conifer somatic embryogenesis: I. Development // Dendrobiology. – 2002. – V. 48. – P. 31-39.
4. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix x leptoleuca*): Part 2. Control for germination and plantlet development / Lelu M.A., Bastien C., Klimaszewska K., Charest P.J. // Plant Cell Tiss. Organ. Cult. – 1994. – V. 36. – P. 117-127.
5. Lelu-Walter M-A., Bernier-Cardou M., Klimaszewska K. Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis // Plant Cell Tiss. Organ. Cult. – 2008. – V. 92. – P. 31-45.
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15, N 4. – P. 473-497.
7. Park Y-S. Implementation in conifers somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirement and development considerations // Ann. For. Sci. – 2002. – V. 59. – P. 651-656.
8. Plant cell, tissue and organ culture: fundamental methods / Eds. O.L. Gamborg, G.C. Phillips. – Berlin: Springer-Velag, 1995. – 358 p.

СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ И ОРГАНОГЕНЕЗ КАК ОСНОВА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ ПОЛУЧЕНИЯ И СОХРАНЕНИЯ ДЕКОРАТИВНЫХ И ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР

И.В. МИТРОФАНОВА, *доктор биологических наук*
Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

Введение

Биотехнологические подходы, основанные на культивировании органов и тканей многолетних садовых растений вне организма, на искусственных питательных средах в регулируемых асептических условиях, открывают принципиально новые возможности для фундаментальных и прикладных исследований. Растительные системы *in vitro* являются удобными моделями для исследования сложных механизмов, лежащих в основе пролиферации, клеточной дифференцировки, гистогенеза, органогенеза, соматического эмбриогенеза и регенерации целого организма из культивируемых клеток, обладающих totipotентностью [1-3, 6, 7, 15, 16, 18, 22, 32]. В прикладном аспекте на основе знаний о биологии клетки *in vitro* разрабатываются меристемные технологии, эмбриокультура, гаплоидные технологии, клеточная селекция, генная и клеточная инженерия [4, 5, 8, 10, 20].

Экспериментально созданные системы *in vitro* весьма многообразны. Используя системы *in vitro*, реализацию totipotентности клетки высшего растения можно направить как по пути соматического эмбриогенеза, так и органогенеза. Количество компетентных клеток зависит от вида, подвида, сорта и типа исходного экспланта. Сохранение проэмбриогенных клеток при субкультивировании находится также в зависимости от трофических и гормональных факторов среды [1, 3, 4, 7, 9, 20, 24].