

Оценка стрессоустойчивости различных генотипов сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) с помощью биотехнологического метода

Е. Ю. Пардаева – Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии, научный сотрудник – Воронежский государственный университет, elena.pardaeva@mail.ru

Т. М. Табацкая – Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии, старший научный сотрудник, ilgis@lesgen.vrn.ru

О. С. Машкина – Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии, зав. лабораторией биотехнологии, кандидат биологических наук, – Воронежский государственный университет, доцент, olga_mashkina@yahoo.com

Выявлены наиболее стрессоустойчивые генотипы сосны обыкновенной с помощью биотехнологического метода путем использования каллусогенезов. Изучены показатели каллусогенеза деревьев сосны обыкновенной, определены наиболее информативные из них.

Ключевые слова: *сосна обыкновенная, каллус, стрессоустойчивость, интенсивность каллусогенезов, частота каллусогенезов, жизнеспособность каллусов*

В настоящее время существует множество глобальных экологических проблем: сокращение генофонда биосферы, загрязнение окружающей среды, сокращение площади лесов, опустынивание, деградация почв и т. д. В последние годы прослеживается тенденция глобального изменения климата. В связи с этим всем живым организмам, особенно растениям, ведущим прикрепленный образ жизни, приходится адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды.

Образование каллуса – защитная реакция на поранение растительной ткани, а также на изменение эндогенного или экзогенного гормонального баланса. Каллус представляет собой неорганизованно пролиферирующую ткань, состоящую из однородных недифференцированных клеток. Установлено, что способность изолированной ткани к каллусообразованию зависит, прежде всего, от генотипа материнского растения, а также от условий культивирования [1, 2].

Среди преимуществ использования клеточных моделей отмечается скорость ответа, возможность контролирования условий культивирования, в том числе и путем создания искусственных стрессовых ситуаций. В настоящее время есть работы в области физиолого-биохимических процессов клеточных популяций, подтверждающие наличие связи между особенностями каллусогенеза и интактными растениями, в которых показана сохранность биохимической специализации (накопление смолы, фенолов в каллусных культурах в зависимости от индивидуальных особенностей исходных деревьев) [3, 4].

Считается, что клеточные культуры *in vitro* – это удобные, хорошо контролируемые модели, которые могут быть использованы в качестве селекционных, индикационных биотест-систем и для лесных древесных растений. В последнее время появляется все больше исследований, посвященных изучению влияния различных стрессующих факторов на растительные организмы (тяжелые металлы, вирусы, низкие и высокие температуры окружающей среды, засоление) с помощью биотехнологического метода [2, 5–11]. Однако исследований по хвойным дре-

весным растениям, в частности сосне обыкновенной, мало. Объясняется это, по-видимому, трудностью её использования как объекта биотехнологических исследований из-за высокой степени инфицируемости вводимого в культуру материала, а также из-за содержания большого количества вторичных соединений (фенолов, терпенов и т. д.), которые в изолированных тканях активизируются и ингибируют деление и рост клеток [12].

Цель работы – установить возможность индикации взрослых деревьев сосны обыкновенной на устойчивость к стрессовым факторам с помощью каллусных культур *in vitro*.

Решаемые задачи:

- ✓ накопление экспериментальных данных об особенностях каллусогенезов различных генотипов сосны обыкновенной;

- ✓ определение наиболее быстрых и доступных для учета реакций каллусогенезов параметров, наглядно их дифференцирующих.

Объекты и методы. В работе использованы деревья сосны обыкновенной, отобранные Н. Ф. Кузнецовой на модельном объекте «Острогжск» (Воронежская обл.). Для получения каллусных культур брали стеблевые экспланты молодых побегов размером 1,0–1,5 см. Каллусные культуры получали и выращивали в условиях культуральной комнаты (2 000 лк, 16-часовой фотопериод, 25–26 °С). Для каждого генотипа исходного дерева брали не менее 20 эксплантов. Эксперимент проводился в 3-кратной повторности. Базовой питательной средой служила среда Мурасига и Скуга с половинным составом макроэлементов [13], гормональное обеспечение осуществляли, используя α-НУК (Sigma, США) в концентрации 2 мг/л и 6-БаП (Sigma, США) – 0,5 мг/л. Углеводное питание обеспечивали 3 %-й сахарозой.

Оценку каллусогенеза проводили визуально с интервалом 5–7 сут по следующим признакам:

- ✓ скорость инициации первичных каллусных культур (СК, сут);

- ✓ интенсивность каллусогенеза (ИК, балл) – рост биомассы каллусной ткани по объёму за фиксированный период культивирования по 5-балль-

ной системе: 1 балл – следы новой ткани; 2 балла – объем каллусной ткани меньше объема экспланта; 3 балла – объем каллуса равен объему экспланта; 4 балла – объем каллусной ткани больше объема экспланта; 5 баллов – интенсивный рост каллусной ткани, в разы превышающий объем экспланта;

✓ частота каллусогенеза (ЧК, %) – отношение эксплантов, образовавших каллус, к общему их числу;

✓ жизнеспособность клеточных культур – появление (сутки) и скорость распространения поврежденной каллусной ткани. Живая и мертвая каллусные ткани визуально легко различаются: светлая – живая и темно-коричневая – поврежденная. Процесс старения каллусных культур в течение одного цикла культивирования оценивали по 5-балльной системе: 1 балл – появление на каллусе одного небольшого участка мертвой ткани; 2 балла – объем некротической ткани заметно меньше объема живой; 3 балла – объем темно-коричневой ткани равен объему светлой ткани; 4 балла – объем темно-коричневой ткани значительно больше объема светлой; 5 баллов – 100 %-е поражение каллусной ткани (вся ткань темно-коричневого цвета).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Stadia.

Оценка эффективности каллусогенезов стеблевой ткани сосны обыкновенной в зависимости от генотипических особенностей дерева

№ дерева	Эффективность каллусогенезов	
	Частота образования, шт./%	Скорость образования, сут
28	96,2	5
36	81,2	5
14	66,6	5
46	64,2	5
41	50,0	7
11	44,4	10
45	41,6	15
34	33,3	10
8	16,6	15
4	14,2	15

Результаты и обсуждение. В ходе эксперимента было установлено, что одним из наиболее информативных параметров, который можно применять в целях индикации, является ЧК. Все деревья по порядку убывания значений данного признака расположились следующим образом: № 28, 36, 14, 46, 41, 11, 45, 34, 8, 4. Далее исследуемые деревья были разбиты на 2 группы: условно устойчивые (ЧК 96,0–50,0 %) – № 28, 36, 14, 46, 41 и условно чувствительные (ЧК 44,4–14,2 %) – № 11, 45, 34, 8, 4 (таблица).

Отмечена прямая зависимость между частотой каллусогенеза и скоростью инициации первичных каллусов. Культуры, имеющие высокие показатели ЧК (условно устойчивые), характеризовались и высокими показателями их инициации – первые реакции наблюдались на 5–7-е сут, и наоборот – у культур с низкими показателями ЧК (условно чувствительные) первые реакции фиксировались на 10–15-е сут (в 2–3 раза медленнее условно устойчивых). Так, например, у дерева № 28 с самым высоким значением ЧК (96,2 %) первичные каллусы появлялись на 5-е сут, в то время как у дерева № 4 с самым низким показателем ЧК (14,2 %) – только на 15-е сут.

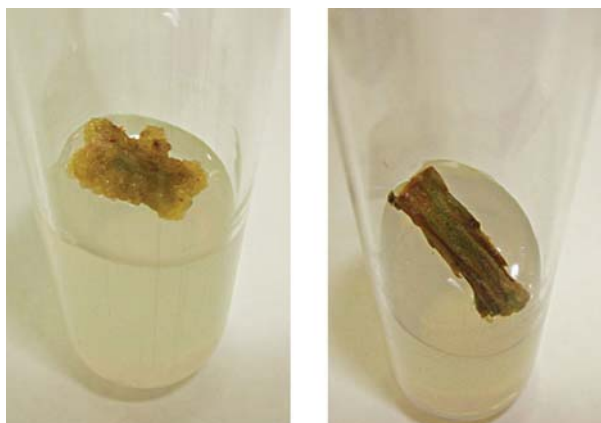
В ходе оценки процесса каллусогенеза по показателю ИК нам удалось выявить наиболее информативные фазы культивирования: начальная и завершающая (рис. 1). Для обеих стадий интенсивность нарастания биомассы клеток выше в группе условно устойчивых деревьев.

Несмотря на наличие разницы по данному показателю между условно чувствительными и условно устойчивыми деревьями, мы пришли к заключению, что для целей индикации предпочтительнее использовать параметр ЧК, тесно связанный со скоростью инициации каллусогенеза, а не показатель ИК. Это связано с тем, что одной из основных задач настоящего исследования является поиск показателей, более простых по учёту и информативных по проявлению реакций. Кроме того, оценка ИК, осуществляемая либо по балльной системе, либо по массе, не лишена элементов субъективизма в первом случае и достаточно трудоёмка – во втором. К тому же следует учитывать факт, что на этапе экспоненци-

ального нарастания биомассы различия в реакции постепенно сглаживаются, вследствие чего признак ИК становится менее информативным [14–16].

В завершающей фазе одного цикла культивирования все клеточные культуры подвержены угнетению ростовых процессов и в дальнейшем – гибели. Одним из ведущих факторов, определяющих ход данного процесса, являются генотипические особенности исходного дерева.

Степень жизнеспособности клеточных культур определяли по наличию или отсутствию повреждённых клеток, их количеству и скорости распространения некротических процессов. Оценку проводили от начала процесса старения ткани до её гибели, применяя признак жизнеспособности по 5-балльной системе (рис. 2).



а

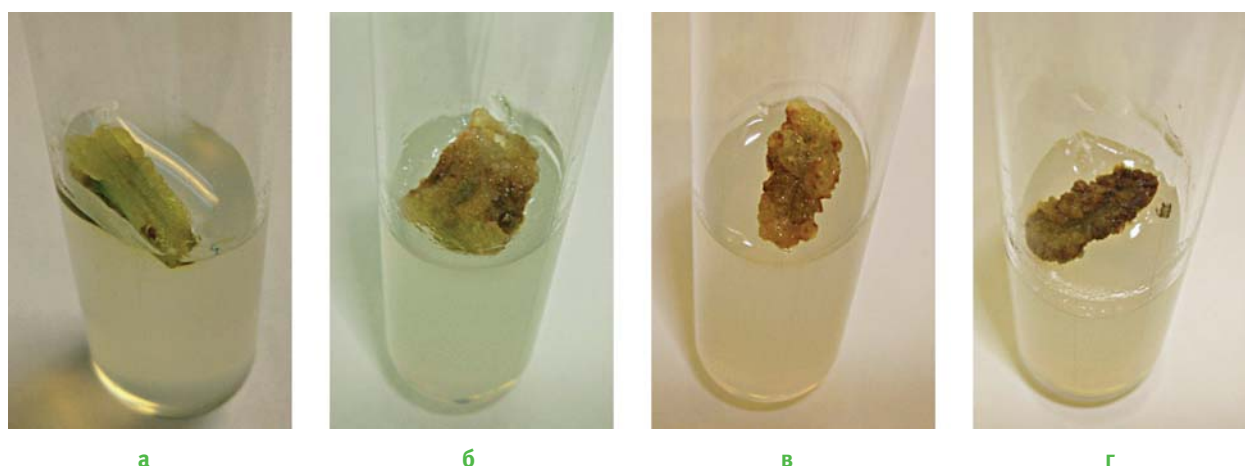
б

Рис. 1. Эффективность каллусогенезов сосны обыкновенной в зависимости от генотипических особенностей дерева

(10-е сут культивирования):

а – дерево № 28 (условно устойчивое);

б – дерево № 4 (условно чувствительное)



а

б

в

г

Рис. 2. Жизнеспособность каллусных культур стеблевых эксплантов сосны обыкновенной в течение одного цикла культивирования: а – нормальная жизнеспособная каллусная культура (0 баллов); б – очаги некротической ткани (3 балла); в – объем поврежденной ткани больше объема светлой, жизнеспособной (4 балла); г – 100%-е поражение каллусной ткани (5 баллов)

Установлено, что сроки начала появления первых некротических участков варьировали в широких пределах – от 5 до 30 сут (рис. 3). Момент появления первых культур с единичными очагами погибших клеток – это начало некротических процессов. Срок распространения некрозов ткани также сильно различается (от 5 до 25 сут). Полученные данные говорят о том, что продолжительность жизни культур, относящихся к группе условно устойчивых деревьев, в 2–3 раза больше, чем чувствительных.

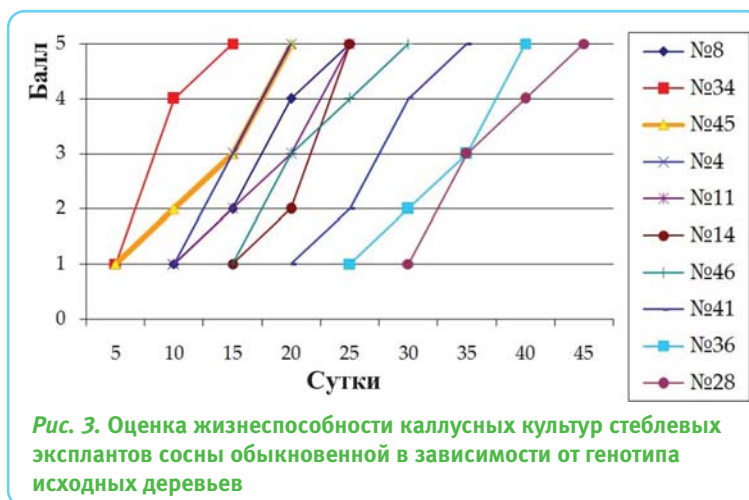


Рис. 3. Оценка жизнеспособности каллусных культур стеблевых эксплантов сосны обыкновенной в зависимости от генотипа исходных деревьев

Выявлена определённая связь между признаком частоты каллусогенеза и визуальным проявлением его старения. Культуры с высокими показателями ЧК (50–96,2 %) отличались и большей жизнеспособностью (20–30 сут). Культуры с малыми значениями ЧК (14,2–44,4 %) погибали на 10–15-е сут культивирования.

Выводы. Общая тенденция, наблюдающаяся в реакциях каллусогенезов, направлена на дифференциацию деревьев по отклику на

стрессовые условия культивирования. Данный факт является свидетельством высокой индикаторной способности каллусогенезов сосны и возможности использования данного метода с целью выбора наиболее устойчивых генотипов. Выявлены наиболее информативные индикаторные признаки: скорость инициации каллусов и связанные с ней частота и жизнеспособность каллусных культур в течение одного цикла.

Список использованной литературы

1. Лутова, Л. А. Биотехнология высших растений / Л. А. Лутова. – СПб. : Изд-во Спб. ун-та, 2010. – 240 с.
2. Кунах, В. А. Пластичность генома соматических клеток и адаптивность растений / В. А. Кунах // Молекулярная и прикладная генетика. – 2011. – Т. 12. – С. 7–14.
3. Park, S. Y. Micropropagation of *Salix pseudolasigyne* from nodal explants / S. Y. Park // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2008. – V. 93. – № 3. – P. 341–346.
4. Путенихин, В. П. Микрклональное размножение зрелых хвойных растений / В. П. Путенихин, И. Марке, Д. Эвальд // Успехи современной биологии. – 1991. – Т. III. – № 1. – С. 137–143.
5. Induction of metal binding compounds and antioxidative defense in callus cultures of two black poplar (*P. nigra*) clones with different tolerance to cadmium / Valentina Iori, Fabrizio Pietrini, Angelo Massacci, Massimo Zacchini // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2012. – V. 108. – P. 17–26.
6. Drought induced alterations in growth, osmotic potential and in vitro regeneration of soybean cultivars/ G. Sakthivelu, M. K. Akitha Devi, P. Giridhar, T. Rajasekaran, G. A. Ravishankar, T. Nedev, G. Kosturkova // Gen. Appl. Plant Physiology. – 2008. – V.34 (1-2). – P.103–112.
7. Manoj Kulkarni. In vitro screening of tomato genotypes for drought resistance using polyethylene glycol / Manoj Kulkarni, Uday Deshpande // African Journal of Biotechnology. – 2007. – V. 6 (6). – P. 691–696.
8. Тихонова, И. Г. Создание устойчивых к вирусам форм вишни методами биотехнологии // Генетические основы эволюции и селекции : сб. науч. тр. / И. Г. Тихонова. – Воронеж : НИИЛ-ГиС, – 2002. – С. 94–98.
9. Терлецкая, Н. В. Неспецифические реакции зерновых злаков на абиотические стрессы in vivo и in vitro / Н. В. Терлецкая. – Алматы : Ин-т биологии и биотехнологии растений, 2012. – 206 с.
10. Петров, Ю. П. Взаимосвязь роста каллуса и числа клубеньков у гороха посевного *Pisum sativum* / Ю. П. Петров // Цитология. – 2012. – Т. 54. – № 12. – С. 925–932.
11. Евсеева, Р. П. Использование асептической культуры тканей в исследованиях морозостойкости яблони / Р. П. Евсеева, В. С. Кудрявкин // Актуальные вопросы генетики и селекции растений. – Новосибирск. – 1980. – 292 с.
12. Шестибратов, К. А. Лесная биотехнология: методы, технологии, перспективы / К. А. Шестибратов, В. Г. Лебедев, А. И. Мирошников // Биотехнология. – 2008. – № 5. – С. 3–22.

13. Murashige, T. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. A. Murashige, T. Skoog / *Physiologia Plantarum*. – 1962. – V. 15. – P. 473–497.
14. Гамбург, К. З. Оценка эффективности каллусообразования и регенерации яровых сортов ячменя, районированных на территории Украины / К. З. Гамбург, Н. И. Рекославская, Я. Б. Блюм // *Цитология и генетика*. – 2009. – № 4. – С. 12–19.
15. Филиппова, И. П. Каллусные культуры сибирских видов хвойных / И. П. Филиппова // *Вестник Красс. ГАУ*. – 2010. – № 9. – С. 54–59.
16. Петров, Ю. П. Взаимосвязь роста каллуса и числа клубеньков у гороха посевного *Pisum sativum* / Ю. П. Петров // *Цитология*. – 2012. – Т. 54. – № 12. – С. 925–932.

Referens

1. Lutova, L. A. Bioteknologiya vysshix rastenij / L. A. Lutova. – SPb. : Izd-vo Spb. un-ta, 2010. – 240 s.
2. Kunax, V. A. Plastichnost' genoma somaticheskix kletok i adaptivnost' rastenij / V. A. Kunax // *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika*. – 2011. – Т. 12. – С. 7-14.
3. Park, S. Y. Micropropagation of *Salix pseudolasigyne* from nodal explants / S. Y. Park // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2008. – V. 93. – № 3. – P. 341–346.
4. Putenixin, V. P. Mikroklonal'noe razmnozhenie zrelyx xvojnyx rastenij / V.P. Putenixin, I. Marke, D. Eval'd // *Uspexi sovremennoj biologii*. – 1991. – Т. III. – № 1. – С. 137–143.
5. Induction of metal binding compounds and antioxidative defense in callus cultures of two black poplar (*P.nigra*) clones with different tolerance to cadmium / Valentina Iori, Fabrizio Pietrini, Angelo Massacci, Massimo Zacchini // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2012. – V. 108. – P. 17–26.
6. Drought induced alterations in growth, osmotic potential and in vitro regeneration of soybean cultivars/ G. Sakthivelu, M. K. Akitha Devi, P. Giridhar, T. Rajasekaran, G. A. Ravishankar, T. Nedev, G. Kosturkova // *Gen. Appl. Plant Physiology*. – 2008. – V.34 (1-2). – P.103–112.
7. Manoj Kulkarni. In vitro screening of tomato genotypes for drought resistance using polyethylene glycol / Manoj Kulkarni, Uday Deshpande // *African Journal of Biotechnology*. – 2007. – V. 6 (6). – P. 691–696.
8. Tixonova, I. G. Sozdanie ustojchivyx k virusam form vishni metodami bioteknologii // *Geneticheskie osnovy evolyuczii i selekczii : sb. nauch. tr. / I. G. Tixonova*. – Voronezh : NIILGiS, – 2002. – С. 94–98.
9. Terleczkaya, N. V. Nespecificheskie reakcii zernovyx zlakov na abioticheskie stressy in vivo i in vitro / N. V. Terleczkaya. – Almaty : In-t biologii i bioteknologii rastenij, 2012. – 206 s.
10. Petrov, Yu. P. Vzaimosvyaz' rosta kallusa i chisla klubenk'ov u goroxa posevnogo *Pisum sativum* / Yu. P. Petrov // *Czitologiya*. – 2012. – Т. 54. – № 12. – С. 925–932.
11. Evseeva, R. P. Ispolzovanie asepticheckoj kul'tury tkanej v issledovaniyax morozostojkosti yabloni / R. P. Evseeva, V. S. Kudryavkin // *Aktual'nye voprosy genetiki i selekczii rastenij*. – Novosibirsk. – 1980. – 292 s.
12. Shestibratov, K. A. Lesnaya bioteknologiya: metody, texnologii, perspektivy / K. A. Shestibratov, V. G. Lebedev, A. I. Miroshnikov // *Bioteknologiya*. – 2008. – № 5. – С. 3–22.
13. Murashige, T. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. A. Murashige, T. Skoog / *Physiologia Plantarum*. – 1962. – V. 15. – P. 473–497.

14. Gamburg, K. Z. Oczenka effektivnosti kallusoobrazovaniya i regeneraczii yarovyx sortov yachmenya, rajonirovannyx na territorii Ukrainy / K. Z. Gamburg, N. I. Rekoslavskaya, Ya. B. Blyum // Czitologiya i genetika. – 2009. – № 4. – S. 12–19.

15. Filippova, I. P. Kallusnye kul'tury sibirskix vidov xvojnyx / I. P. Filippova // Vestnik Krass. GAU. – 2010. – № 9. – S. 54–59.

16. Petrov, Yu. P. Vzaimosvyaz' rosta kallusa i chisla kluben'kov u goroxa posevnogo Pisum sativum / Yu. P. Petrov // Czitologiya. – 2012. – T. 54. – № 12. – S. 925–932.

Assessment stressresistance of various genotypes of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) using biotechnological methods

E. Yu. Pardayeva – Russian Research institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology, Researcher – Voronezh State University, elena.pardaeva@mail.ru

T. M. Tabatskaya – Russian Research institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology, Researcher, ilgis@lesgen.vrn.ru

O. S. Mashkina – Russian Research institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnolog Head of Laboratory, Candidate of Biological Sciences – Voronezh State University, assistant professor, olga_mashkina@yahoo.com

Purpose of work – identify the most resistant genotypes of adult trees of Scots pine using biotechnological methods based on the use of callusogenesis.

The experiment was performed on callus cultures of adult trees of Scots pine, selected by N.F. Kuznetsova on the model object «Ostrogzhsk.» For each original tree genotype was taken at least 20 explants. The experiment was conducted in a 3-fold repetitions. The basic nutrient medium is a Murashige and Skoog with half composition of makrosalt. Hormonal software was performed using α -NAA at a concentration of 2 mg / l and 6 BaP – 0.5 mg / l. Carbohydrate supply provides 3 % sucrose. Assessment of callusogenesis was performed visually with interval of 5–7 days on the parameters: the rate of initiation of primary callus cultures (day); intensity of of callus formation (points); callusogenesis rate (%); viability cell culture (day) as well as the aging process callus cultures for one culturing cycle (points). Hormonal software was performed using α -NAA (Sigma, USA) at a concentration of 2 mg / l and 6 BaP (Sigma, USA) – 0.5 mg / l. Carbohydrate supply provides 3 % sucrose. Assessment was performed visually callusogenesis with an interval of 5–7 days on the following parameters: speed of initiation of primary callus cultures (day); intensity (points) and frequency of callusogenesis (%); viability callus tissue (day) as well as the aging process callus cultures for one culturing cycle (points).

On the basis of the data trees were differentiated into 2 groups: relatively resistant and sensitive. It is shown: one of the most informative parameters that can be used to indication, is the frequency callusogenesis. It should be noted: culture, with high levels of the callusogenesis frequency (relatively stable) characterized by high levels of initiation. Conversely, cultures with low callusogenesis frequency (relatively sensitive) had a first reaction to 10-15 days, which is 2–3 times slower resistant.

During the analysis process callusogenesis on the «growth rate» of tissue we were able to identify the most informative phase of cultivation: initial and final.

Differences between groups resistant and sensitive trees are installed and callus tissue viability: the starting date of necrotic tissue vary widely – from 5 to 30 days. Dates spread necrosis also vary – from 5 to 25 days. It is found: lifetime of callus belonging to groups resistant trees is 2–3 times more than sensitive. There is a connection between the parameters of the frequency callusogenesis and visual manifestation of its aging. Typically, the culture with high parameters of callusogenesis frequency different more vitality.

The data talk about high indicates ability of pine indicator callusogenesis and possibility of using this method in order to select the most resistant genotypes.

Keywords: Scots pine, callus, stress resistance, intensity of callusogenesis, frequency of callusogenesis, callus viability