

ОСОБЕННОСТИ АНДРОГЕНЕЗА *IN VITRO* У ДЕРЕВЬЕВ ЛИСТВЕННИЦЫ СИБИРСКОЙ С РАЗНОЙ СТЕПЕНЬЮ УСТОЙЧИВОСТИ К ПОРАЖЕНИЮ ЛИСТВЕННИЧНОЙ ПОЧКОВОЙ ГАЛЛИЦЕЙ (*Dasineura rozhkovi* Mam. et Nik.)

На юге Сибири деревья лиственницы *Larix sibirica* Ledeb. часто подвержены массовому заражению лиственничной почковой галлицей *Dasineura rozhkovi* Mam. et Nik. (Diptera: Cecidomyiidae) – основным вредителем лесосеменных хозяйств. Галлица может заражать деревья лиственницы уже в 8-14-летнем возрасте (Баранчиков, 1995, 2001). У взрослых деревьев до 80% ветвей часто оказываются сплошь покрытыми галлами. Вместе с тем, в насаждениях лиственницы, поврежденной почковой галлицей, систематически встречаются отдельные деревья, устойчивые к повреждению. Такие деревья представляют ценный материал для проведения генетико-селекционных исследований, направленных на создание устойчивых лесосеменных плантаций.

При выращивании устойчивых насаждений лиственницы перспективно применение новых биотехнологий. Так, микрорепликация *in vitro*, может помочь быстро и с высокой эффективностью размножить устойчивые к лиственничной почковой галлице экземпляры лиственницы сибирской. Одним из современных направлений в исследованиях культуры ткани служит культура пыльников, результатом которой является андроклиния (андрогагенез *in vitro*). Это явление связано с переключением развития спорогенных клеток пыльника с гаметофитного пути на спорофитный путь развития. Смены поколений (спорофитного на гаметофитный), характерной для высших растений, в естественных условиях не происходит – спорогенные клетки микроспор и пыльцевых зёрен ведут себя подобно зиготам и дают начало эмбрионам.

Андрогагенез *in vitro* получен у многих семейств покрытосеменных растений и особенно широко распространен у злаков (Круглова и др., 1995). Случаи появления андрогагенеза *in vitro* у хвойных до сих пор не были известны, хотя эксперименты по культуре пыльников проводились с 50-х годов с *Ginkgo biloba* (Tuleske, 1953), *Picea abies*, *Pinus resinosa* (Bonga, Foulger, 1970), *Pinus sibirica* (Скрипаченко, 1985).

Представители рода *Larix* являются идеальным объектом для получения андрогенных культур у хвойных, так как необходимые условия инициации андрогенеза, разработанные на примере злаков, у лиственницы сибирской происходят в природе. Микроспорофиллы лиственницы сибирской получают естественную обработку холодом в период мейоза, то есть на наиболее подходящей стадии развития эксплантов при их вводе в культуру *in vitro*.

Цель настоящего исследования заключалась в изучении особенностей андрогенеза *in vitro* у деревьев лиственницы сибирской, пораженных лиственничной почковой галлицей и устойчивых к этому насекомому.

Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили 30-40-летние деревья лиственницы сибирской произрастающие на территории дендрария Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН (Академгородок г. Красноярск) и близ стационара Института леса "Чёрное озеро" (Ширинский район Республики Хакасия) в разной степени заселённые галлицей.

В течении осеннее-зимнего периода проводили сбор микростробилов с поражённых и непоражённых галлицей деревьев. Стерилизацию микростробилов проводили 3% раствором йода в течение 15 мин., после чего их трехкратно промывали по 15 мин. в стерильной дистиллированной воде, а затем обрабатывали 3% перекисью водорода в течение 3 мин.

Культивирование микростробилов проводили на агаризированной среде MS (Murashige, Skoog, 1962), с добавлением гормона ауксиновой природы – 2,4-Д в концентрациях 0,2-2 мг/л.

Экспланты фиксировались модифицированной смесью Карнуа (абсолютный спирт и уксусная кислота в соотношении 3:1) на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14 и 21 сутки, а так же через 30-60 суток культивирования.

Цитологический анализ производился на давленных препаратах. Предварительная обработка образцов проводилась 1 н HCl при 60°C в течение 5-10 мин. После этого их окрашивали ацетогематоксилином в течение 10-20 мин. при 60°C, с добавлением 4% железоаммонийных квасцов. Давленные препараты готовили в кашле глицерина.

Просмотр образцов осуществляли при помощи микроскопов МБИ-6, СССР и KS 300 Imaging System, Германия. Замеры клеток и эмбриональных структур проводили при помощи окуляр-микрометра с последующим переводом полученных единиц в микрометры. Мор-

фологические изменения фиксировали цифровой камерой Nikon Coolpix 950.

Для получения статистических данных просматривалось по 20 препаратов для каждого срока фиксации. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием стандартного пакета Excel 98.

Результаты и обсуждение

При введении в культуру *in vitro*, микростробилы лиственницы сибирской, собранные с пораженных и не пораженных лиственничной почковой галлицей деревьев в осенне-зимний период (с октября по февраль), находились в профазе I мейоза (стадия пахинемы). Было обнаружено, что при внесении в этот период образцов генеративных и вегетативных органов в тепло, они продолжали свое развитие. В микростробилах через 7-14 дней образовывалась зрелая пыльца, а брахибласты формировали хвою. Эти опыты свидетельствуют о том, что генеративные и вегетативные органы лиственницы сибирской не имеют органического покоя в зимний период и при благоприятных условиях способны продолжать свое развитие.

Однако на этом этапе наблюдалось некоторое расхождение в сроках развития генеративных и вегетативных органов у пораженных (П) и непораженных (НП) галлицей деревьев. Так, созревание пыльцы у П происходило в среднем на 3 дня раньше чем у НП, а появление хвои у П происходило с задержкой на 4 дня.

Введение микроспорofilлов лиственницы сибирской на среду MS с различной концентрацией гормона 2,4-Д (0,2 мг/л, 0,5 мг/л и 2 мг/л) в осенние сроки (октябрь, ноябрь) показало, что более перспективными для культивирования оказались пониженные концентрации гормона (0,2 мг/л и 0,5 мг/л). На средах с таким содержанием гормона через 4 суток мейоз завершался, а через 20 суток начинался активный процесс каллусообразования. Дальнейшее культивирование к положительным результатам не привело. На среде с более высокими концентрациями 2,4-Д (1-2 мг/л) развития микроспорofilлов не наблюдалось и через 20 дней они погибали.

Зимние и весенние сроки культивирования оказались более успешными. При посадке микроспорofilлов на среду MS с концентрацией 0,2 мг/л и 0,5 мг/л 2,4-Д морфогенетические процессы протекали одинаково. На 4-е сутки культивирования в микроспорofilлах, собранных с непораженных деревьев, завершился мейоз, сопровождающийся распадом тетрад. В микроспорofilлах пораженных лиственничной почковой галлицей деревьев мейоз проходил асинхронно и завершился лишь на 7-е сутки. Через 9 суток размеры микроспор увели-

чилились до 33,8 мкм и наблюдалось выпячивание цитоплазмы клеток. На 10-12-ые сутки культивирования завершался митоз, в результате которого образовывались 2-х ядерные структуры. При этом одно из ядер перемещалось в “пыльцевую трубку” и между образовавшимися клетками появлялась межклеточная перегородка. Таким образом, вместо проталлиальных делений, в результате которых в природе микроспоры превращаются в пыльцевые зерна и образуется мужской гаметофит, в культуре *in vitro* проходит деление микроспоры на равные клетки, в результате которого она становится на аномальный (спорофитный) путь развития. Далее в течение 2-3 недель происходили активные клеточные деления – пло формирование эмбриональной массы. Через 2 месяца начиналось структурирование тканей, и формировались эмбриониды, которые можно было наблюдать на поверхности каллуса невооруженным глазом. Несмотря на отставание в темпах развития, микроспороциты с пораженных галлицей деревьев также как и с непораженных были способны формировать эмбриониды.

Формирование эмбрионидов шло двумя путями. **I путь:** деление одной из двух клеток приводит к образованию шарообразной структуры – “головки”. Деление второй клетки приводит к образованию вытянутой “ножки”. Длина такого многоклеточного эмбриоида составляет в среднем 160 мкм, ширина 110 мкм. Иногда при таком пути развития формировались глобулярные зародыши, характерные как для покрытосеменных (Батыгина, 1999), так и для голосеменных растений. **II путь:** эмбриониды, развивающиеся по второму пути, возникали на поверхности органогенного каллуса. Многоклеточные эмбриониды такого типа имеют вытянутую торпедообразную форму и состоят из продольно ориентированных клеток. Размеры их достигают в среднем 252,8 мкм в длину и 73,6 мкм в ширину.

На среде с более высокими концентрациями 2,4-Д (1-2 мг/л) через 20 дней образовывался рыхлый, прозрачный или желтоватый неорганогенный каллус, формирования эмбрионидов не происходило и через 2 месяца экспланты погибали.

Закключение

Генеративные и вегетативные органы лиственницы сибирской не имеют органического покоя и в благоприятных условиях способны продолжать свое развитие. Наиболее перспективным для получения андрогенеза *in vitro* оказалось культивирование микростробилов лиственницы сибирской на среде MS с низкими концентрациями ауксина – 2,4-Д (0,2-0,5 мг/л) в зимние и весенние сроки. При этом происходило формирование органогенного каллуса и эмбрионидов двух типов: шарообразной и торпедообразной формы. Несмотря на то, что процессы

образования органогенного каллуса и эмбриоидов из микроспорофиллов с пораженных листовичной почковой галлицей деревьев происходили с задержкой в 3-4 дня, они все же оказались способными к андрогенезу *in vitro*. Андрогенный каллус и андрогенные зародыши, впервые полученные у сибирских видов хвойных на примере листовичницы сибирской, представляют собой ценный коллекционный материал для генетико-селекционных исследований.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 02-04-48168

Литература

Баранчиков Ю.Н. Этапы морфогенеза вегетативных почек листовичницы сибирской и его модификация насекомыми-галлообразователями // Ботанические исследования в Сибири. – Красноярск: КО РБО, 1995. – Вып. 4. – С. 12-18.

Баранчиков Ю.Н. Насекомые-галлообразователи // Исаев А.С. и др. Популяционная динамика лесных насекомых. – М.: Наука, 2001. – С. 172-181.

Батыгина Т.Б. Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей // Физиология растений. – 1999. Т. 46, № 6. – С. 884-898.

Круглова Н.Н., Горбунова В.Ю., Батыгина Т.Б. Эмбриогенез как путь морфогенеза в культуре изолированных пыльников злаков // Успехи совр. биол. – 1995. – Т. 115, вып. 6. – С. 692-705.

Скрипаченко Г.А. Использование методов геносистематики для исследования листовичницы Сибири. Автореф. дис. канд. биол. наук. – Красноярск, 1985. – 26 с.

Bonga J. M., Fowler D. P. (1970): Growth and differentiation in gametophytes of *Pinus resinosa* cultured *in vitro* // Canadian J. Bot. – V.48 – P. 2205-2207.

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.

Tuleske W. A tissue derived from the pollen of *Ginkgo* // Science. – 1953. – V. 117 – P. 599-600.