

КАЛЛУСОГЕНЕЗ И РЕГЕНЕРАЦИИ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* *PINUS SYLVESTRIS*

Моисеева Е. А. , Степанова А. Ю. , Карташов А. В. , Злобин И. Е.

ФГБУН "Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН", Москва
violetsusanoo@gmail.com

Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) является наиболее распространенным видом из рода *Pinus* в мире. Широко распространена на территории Евразии от Западной Европы до Восточной Сибири. Сосна имеет большое экономическое значение, так как ее древесина используется в различных отраслях промышленности и в строительстве. Однако до сих пор не решена проблема получения высокопродуктивных деревьев. Для ее решения перспективно использовать методы биотехнологии, в частности культивирование растительного материала *in vitro*. Известно, что голосеменные являются более сложными для работы объектами, по сравнению с покрытосеменными, а сосна обыкновенная считается особенно трудной для культивирования *in vitro* даже среди других представителей рода *Pinus*. Вследствие этого не разработан эффективный протокол по введению в культуру *in vitro* и морфогенезу *Pinus sylvestris*. Целью нашей работы являлся подбор условий для получения каллусов *Pinus sylvestris* L. и регенерации из них растений.

Семена для исследования стерилизовали 96% спиртом 5 секунд и 20% коммерческим отбеливателем "Белизна" 15 минут, трижды ополаскивали стерилизованной дистиллированной водой. Стерильные семена помещали в чашки Петри на агаризованную среду MS (2% сахарозы) без добавления гормонов и культивировали при температуре 25°C и 24 часовом освещении. На 7-10 сутки наблюдали прорастание семян, общий процент всхожести составил 30%. У 1-2 недельных проростков отделяли гипокотиль и помещали на питательную агаризованную среду MS (2% сахарозы, 500 мг/л казеина и 500 мг/л L-глутамин) с добавлением 1,0 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л БАП, а также MS с добавлением 5,0 мг/л БАП и 0,5 мг/л НУК. На 10-12 сутки наблюдали образование каллуса с частотой 80% на среде с 2,4-Д и БАП и 45% – на среде БАП и НУК. Цикл культивирования составлял 28 дней. Однако спустя 2 недели наблюдали некротизацию 90% каллусов на среде с БАП и НУК. На 50-60 сутки культивирования наблюдали спонтанное побегообразование, более активное – на среде с содержанием 2,4-Д и БАП. Микропобеги были перенесены в пробирки со средой MS с добавлением 1 мг/л ИУК, 1% сахарозы для дальнейшего укоренения.

Таким образом, нами были подобраны условия стерилизации семян и получение каллусов *Pinus sylvestris* L.. Показано, что среда MS с добавлением 1,0 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л БАП является универсальной как для каллусообразования, так и для получения микропобегов *Pinus sylvestris* L..

Ключевые слова: сосна обыкновенная, культура *in vitro*, каллус, морфогенез, растения-регенеранты

CALLUSOGENESIS AND REGENERATION IN *PINUS SYLVESTRIS* IN VITRO CULTURE

Moiseeva E. A. , Stepanova A. Y. , Kartashov A. V. , Zlobin I. E. K.A.

Timiryazev Institute of Plant Physiology Russian Academy of Sciences
violetsusanoo@gmail.com

Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) is the most widespread species of the genus *Pinus* in the world. It is widespread in Eurasia, ranging from Western Europe to Eastern Siberia. Pine has high economic importance, as its wood is used in various branches of industry and in construction. However, the problem of obtaining highly productive trees has not yet been solved. To solve it, it is promising to use biotechnology methods, in particular the *in vitro* cultivation of plant material. It is known that gymnosperms are more difficult to work with than angiosperms, and Scots pine is considered especially difficult to cultivate *in vitro*, even among other plants of the genus *Pinus*. As a result, an effective protocol for the initiation of *in vitro* culture and morphogenesis of *Pinus sylvestris* has not been developed. The purpose of our work was to select conditions for obtaining the callus cultures and the regeneration of plants from them.

The seeds for the study were sterilized with 96% alcohol for 5 seconds and 20% commercial bleach "Belizna" for 15 minutes, rinsed three times with sterilized distilled water. Sterile seeds were placed in Petri dishes on an agarized medium MS (2% sucrose) without hormonal additives and cultivated at 25°C and 24 hours of illumination.

The first signs of seed germination were detected after 7-10 days, the total germination rate was 30%. Hypocotyl was separated from 1-2 week old seedlings and placed on the surface of MS medium (2% sucrose, 500 mg/l casein and 500 mg/l L- glutamine) with the addition of 1.0 mg/l 2,4-D and 0.1 mg/l BAP, as well as MS with the addition of 5.0 mg/l BAP and 0.5 mg/l of NAA. On the 10-12th day the initial signs of formation of the callus were detected with a frequency of 80% on a medium with 2,4-D and BAP and 45% on a medium with BAP and NAA. The cultivation cycle was 28 days. However, after 2 weeks, necrotization of 90% of calluses was observed on a medium with BAP and NAA. Spontaneous shoot formation was detected after 50-60 days of cultivation, more active on a medium containing 2,4-D and BAP. The microshoots were transferred to tubes with MS medium with the addition of 1 mg/l IAA, 1% sucrose for further rooting.

Therefore, we selected the conditions for seed sterilization and the production of *Pinus sylvestris* L. calluses. It was shown that the MS medium with the addition of 1.0 mg/l 2,4-D and 0.1 mg/l BAP is universal both for callus formation and for the production of *Pinus sylvestris* L. microshoots.

Keywords: Scots pine, *in vitro* culture, callus, morphogenesis, regenerated plants