



УДК 581.143.6; 582.475.2; 630\*23

## Особенности получения каллусной культуры пихты сибирской *Abies sibirica* Ledeb.

А. В. Третьякова<sup>1,2</sup>, Е. А. Демина<sup>3</sup>, Н. И. Рекославская<sup>1,2</sup>,  
Р. К. Салаяев<sup>1,2</sup>, А. С. Столбиков<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск

<sup>2</sup>Иркутский государственный университет, Иркутск

<sup>3</sup>Национальный парк «Тункинский», Кырен

E-mail: Anastasiya\_chepi@mail.ru

**Аннотация.** Исследование посвящено проблеме введения в культуру *in vitro* растений пихты сибирской *Abies sibirica* Ledeb. В качестве исходного экспланта использовали вегетативные части взрослых растений, произрастающих на территории г. Иркутска и в 70 км от города. Подобраны условия стерилизации растительного материала, компоненты питательной среды для культивирования *in vitro*, тип экспланта. Используя апикальные почки побегов и питательные среды с различным соотношением регуляторов роста, удалось оптимизировать условия роста и развития побега, индукции каллусогенеза в весенне-летний период. Получены различные типы каллусов и изучены их морфогенетические особенности при культивировании на разных средах.

**Ключевые слова:** *Abies sibirica* Ledeb., каллусная культура, культура тканей *in vitro*, микроклональное размножение хвойных.

### Введение

Основные лесообразующие виды хвойных пород деревьев обладают рядом важных свойств, которые определяют их экологическое, лесохозяйственное значение и коммерческую ценность для декоративного озеленения. Это обуславливает актуальность размножения ценных форм хвойных пород для решения проблемы сохранения генофонда растений в России и создания плантационных насаждений. Достижения в области культуры клеток и тканей растений привели к созданию принципиально нового метода вегетативного размножения – клонального микроразмножения, что позволяет получать *in vitro* растения, генетически идентичные исходному экземпляру. В основе метода лежит уникальная способность растительной клетки реализовывать присущую ей тотипотентность. Для этого различные ткани растений помещают на питательные среды с добавлением регуляторов роста, после чего происходит дедифференциация исходного экспланта и формирование каллуса. Эти культуры пассируют, а затем, изменяя концентрацию регуляторов роста, вызывают органогенез – формирование по-

бегов и их укоренение. Одним из перспективных направлений микрклонального размножения в лесной биотехнологии в последнее время является соматический эмбриогенез, когда соматические клетки растений становятся на путь эмбриогенеза и формируют зародыши будущих растений, идентичные материнскому генотипу [7; 12].

В то же время хвойные породы являются одними из наиболее сложных объектов для культивирования *in vitro*, поскольку имеются специфические трудности: их ткани содержат большое количество вторичных соединений, ингибирующих деление и рост клеток, а также множество поверхностных микроорганизмов, что снижает способность тканей к регенерации. Установлено, что генотип донорного растения может определять способность эксплантов формировать пролиферирующий эмбриогенный каллус и соматические зародыши [7]. На сегодняшний день разработана технология микрклонального размножения более 40 видов хвойных, среди них разные виды сосны: *Pinus radiata*, *P. palustris*, *P. sylvestris*, *P. sabiniana*, *P. sibirica*, *P. pumila*, *P. taeda*, *P. virginiana* [6; 8; 12; 14]; лиственницы: *Larix sibirica*, *L. gmelinii*, *L. sukaczewii* [4]; ель *Picea ajanensis* [4], псевдотсуга Мензиса *Pseudotsuga menziesii* и др. [9].

Большинство исследований, посвящённых проблеме микрклонального размножения хвойных пород древесных растений *in vitro*, выполнено с использованием в качестве исходных эксплантов мегагаметофита, зрелых и незрелых зародышей, семядолей, гипокотила, что связано с высокой способностью этих структур к морфогенезу [5], в том числе описывается введение в культуру незрелых зиготических зародышей пихты сибирской и получение на их основе морфогенных каллусов, способных к образованию эмбриоидов [2].

Однако использование семенного поколения не позволяет полностью воспроизвести генотип исходного растения. В зрелом растении генотип реализуется в фенотип, и, проводя отбор среди таких экземпляров, можно выбрать плюсовые деревья для клонирования *in vitro*. Поэтому наибольший интерес представляет использование в качестве первичного экспланта вегетативных частей растений (сегментов побегов и зрелой хвои). В научной литературе имеется ряд публикаций, свидетельствующих о таких успешных экспериментах, выполненных на растениях сосны: *Pinus roxburghii*, *P. patula*, *P. wallichiana*, *P. sibirica*; лиственницы: *Larix decidua*, *L. leptolepis*, *L. laricina*, *L. x eurolepis*, или европейской *Picea abies*, можжевельника сибирского *Juniperus sibirica*, хвойника односемянного *Ephedra monosperma* [1; 5; 7; 12].

Целью данной работы явилось введение в культуру *in vitro* растений пихты сибирской (*Abies sibirica*) с использованием в качестве первичных эксплантов вегетативных частей растений и изучение влияния условий культивирования и регуляторов роста на рост и каллусогенез изолированных эксплантов.

### **Материалы и методы**

Пихта сибирская размножается преимущественно семенами, но возможно и вегетативное размножение отводками: иногда в природе нижние ветви пихты сахалинской, сибирской, кавказской укореняются сами собой. Поскольку известно, что при клональном размножении *in vitro* добиться укоренения побегов хвойных растений удаётся не всегда, указанный факт позволил остановить выбор объекта исследований на этом виде хвойных.

Материал получали от растения пихты, произрастающего на территории СИФИБР СО РАН (Иркутск), а также от дикорастущих пихт в районе пос. Подкаменная (70 км от г. Иркутска).

Срезанные верхние части побегов длиной около 5 см промывали водой с мылом и стерилизовали в 10%-ном растворе дезинфицирующего средства «Domestos» в течение 15 мин. Затем экспланты 3–5 раз промывали стерильной водой по 10 минут, при последней промывке добавляли 1 каплю коммерческого препарата «Эпин» (ННПП «НЭСТ М», Москва). Далее стерильным скальпелем удаляли наружный слой клеток на срезах экспланта. Апикальные почки освобождали от почечных чешуй и помещали на питательную среду. Хвою нарезали скальпелем на сегменты длиной 5–6 мм. У молодых побегов снимали верхний слой коры, разрезали их на более мелкие участки длиной около 1 см, рассекали по длине отрезка и срезанной стороной помещали на питательную среду.

Для получения каллусной культуры экспланты помещали в стерильные поликарбонатные культивационные сосуды типа «Мажента» (Sigma, США) и культивировали при +26 °С, световом периоде 16 ч и освещённости 4–5 тыс. люкс. Иногда предварительно экспланты выдерживали в темноте в течение трёх суток при +26 °С.

Для проведения экспериментов использовали питательную среду Мурашиге и Скуга (MS) с сахарозой и агаром (Murashige and Scoog basal medium with sucrose and agar powder, Sigma, США) [13], и среду McCown'a для древесных растений (McCown's woody plant basal salt mixture, Sigma, США) [11]. В питательные среды также вносили тиамин 0,5–10 мг/л; пиридоксин 0,5–2 мг/л; никотиновую кислоту 0,5–5 мг/л; глицин 2 мг/л; миоинозит 100 мг/л; аскорбиновую кислоту (Россия) 1 мг/л; пептон (Serva, США) 500 мг/л. В качестве регуляторов роста использовали следующие фитогормоны и регуляторы роста: индолилмасляную кислоту (ИМК) 0,6–1 мг/л; индолилуксусную кислоту (ИУК) 0,5–1 мг/л;  $\alpha$ -нафтилуксусную кислоту (НУК) 0,1–1 мг/л; кинетин 0,5 мг/л; абсцизовую кислоту (АБК) 0,1 мг/л; гиббереллин 0,1–1 мг/л; 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) 0,5–2 мг/л; 6-бензиламинопуридин (БАП) 0,5–10 мг/л. Все остальные реактивы, кроме отдельно указанных, производства Sigma (США).

В среду для культивирования добавляли также антибиотик карбенциллин или цефотаксим (Россия) 200 мг/л.

### **Результаты и обсуждение**

Основную сложность на первом этапе клонального микроразмножения, в первую очередь для древесных растений, представляет ингибирование,

ние ростовых процессов экспланта токсичными веществами, выделяемыми в среду. В результате травмы, полученной эксплантом при изолировании, активизируются ферменты, окисляющие фенолы растений (фенолазы). Продукты окисления ингибируют деление и рост клеток экспланта. Через 2–3 дня после помещения экспланта на питательную среду происходило его побурение. Было обнаружено, что промывка экспланта слабым раствором аскорбиновой кислоты (1 мг/л) и добавление к питательной среде поливинилпирролидона (Polyclar AT, BDH Chemicals, Англия) 10 г/л способствовали тому, что эксплант более продолжительное время имел светло-зелёную окраску и побурение начиналось значительно позднее – через 1–1,5 недели.

Вторая проблема, возникшая в ходе работы – сильное заражение эксплантов бактериальной и грибной микрофлорой. Частично заражение было подавлено путём добавления в питательную среду антибиотиков.

Было обнаружено, что хороший эффект оказывает добавление АБК в концентрации 0,1 мг/л. При этом эксплант долгое время оставался без видимых некротических пятен, и спустя примерно 2–2,5 недели начиналось образование каллуса. Однако такой эффект отмечался лишь зимой и в начале весны. Начиная с конца марта, добавление АБК в питательную среду оказывало ингибирующее воздействие на каллусообразование, что, очевидно, связано с интенсификацией метаболизма в растениях пихты, активацией меристем в этот период в связи с увеличением продолжительности светового дня. По этой причине позже отказались от использования АБК в эксперименте.

Усилению каллусообразования способствовало добавление при отмывке от стерилизующего агента коммерческого препарата «Эпин» – синтетического брассиностероида, аналога природного эпибрассинолида. Это вещество является антистрессовым регулятором роста и ускоряет адаптацию растений. Обработка препаратом давала более жизнеспособные экспланты, активизировала дедифференциацию их клеток, способствовала росту каллуса и отдаляла этап побурения эксплантов или каллусов.

После асептической обработки исходных эксплантов и помещения их на питательную среду сосуды выдерживали в течение трёх суток в тёмном помещении, а затем переносили в комнату для выращивания растений на свету. Такой подход позволил на первых этапах снизить степень заражения эксплантов бактериальной микрофлорой. Однако позже не было отмечено стимулирующего эффекта темноты на жизнеспособность эксплантов и каллусообразование, поэтому далее экспланты культивировали только в световой комнате для выращивания растений.

Наиболее сложным периодом для индукции роста апикального побега и каллусогенеза явился осенне-зимний сезон примерно с конца октября до середины февраля. В это время случаи образования каллуса происходили редко, в основном отмечали рост апикальных побегов, а также их витрификацию. Начиная со второй половины февраля случаи каллусообразования участились. Таким образом, наиболее удачным периодом при введении

в культуру *in vitro* эксплантов пихты сибирской явился весенне-летний период, когда в растениях после периода покоя активизируются физиологические процессы и начинается активная ассимилирующая деятельность и пролиферация меристем.

В качестве исходного экспланта растений пихты сибирской использовали вегетативные части растений: хвою, апикальные почки и сегменты побегов. В зависимости от типа экспланта образование каллуса происходило по-разному.

При использовании в качестве первичного экспланта зрелой хвои не было отмечено ни одного случая каллусообразования, через 1–2 недели появлялись некрозы, далее происходила гибель экспланта. Это свидетельствует о глубокой специализации клеток хвои и проблемах их дедифференцировки. Наиболее часто каллус образовывался из верхушечных почек (примерно 65 % от всех полученных каллусов). При этом каллус образовывался через 2–3 недели после помещения на питательную среду, появления некрозов практически не наблюдали, причиной гибели в основном являлось заражение. Если на питательную среду помещали небольшие сегменты молодых побегов, каллус начинал расти примерно через 2–3 недели, в конце весны – через 1–2 недели. Доля каллусов, полученных из эксплантов этого типа, составляла примерно 35 %. Рост каллуса начинался, как правило, на тех стеблевых эксплантах, где находились верхушечные почки. Однако в этом случае отмечали наиболее частое заражение, что представляло определённую проблему при работе с такими эксплантами.

Таким образом, наиболее удачным растительным материалом для использования в качестве первичного экспланта при введении в культуру *in vitro* являются апикальные меристемы (почки), поскольку они наименее подвержены микробному заражению, их клетки проявляют компетентность (способность реагировать на экзогенные фитогормоны и регуляторы роста) и наиболее способны к каллусогенезу. Именно этот тип эксплантов использовали в дальнейшей работе.

С целью подбора наиболее эффективной питательной среды для индукции каллусообразования в осенне-зимний период использовали среды MS с добавлением сахарозы, витаминов, глицина 2 мг/л; миоинозита 100 мг/л; аскорбиновой кислоты 1 мг/л; пептона 500 мг/л, ИМК 1 мг/л; ИУК 1 мг/л; АБК 0,1 мг/л; гиббереллина 0,1 мг/л; и различным соотношением 2,4-Д (0,1; 0,5 мг/л) и БАП (1; 5; 10 мг/л). Через 3–5 недель после помещения апикальных почек на питательную среду наблюдали образование каллусов (рис. 1, А; Б). Каллусы имели различную окраску (от светло-зелёной до буровато-зелёной), рыхлую консистенцию. Со временем все каллусы приобретали бурую окраску. Иногда на них формировались светло-зелёные глобулы. Наиболее оптимальной для индукции каллусообразования в этот период времени года была среда, содержащая 2,4-Д 0,5 мг/л, БАП 5 мг/л.

В целом в осенне-зимний период частота каллусообразования была довольно низкой. При этом добавление ИМК, ИУК, кинетина, гибберелли-

на не оказывало стимулирующего эффекта. Поэтому в дальнейшем использовали питательные среды MS, содержащие сахарозу 30 г/л, тиамин 10 мг/л; пиридоксин 2 мг/л; никотиновую кислоту 5 мг/л; глицин 2 мг/л; миоинозит 100 мг/л; аскорбиновую кислоту; пептон 500 мг/л; АБК 0,1 мг/л; гиббереллин 0,1–1 мг/л; а также высокие концентрации 2,4-Д: 1 и 2 мг/л. Содержание БАП оставалось прежним – 1; 5 и 10 мг/л. Увеличение концентраций 2,4-Д и разное соотношение регуляторов роста оказывало на экспланты различное воздействие.

На среде с содержанием 2,4-Д 1 мг/л и БАП 10 мг/л наблюдали значительный рост побега, при этом на участке, прилегающем к верхушечной части побега, происходило каллусообразование и последующее побурение после 4 недель культивирования (рис. 2, А; Б). Постепенно область побурения увеличивалась и распространялась на нижнюю часть побега (см. рис. 2, Б).

При увеличении концентрации 2,4-Д до 2 мг/л и использовании высоких концентраций БАП (5 и 10 мг/л) происходило формирование искривлённых, уродливых побегов с одновременной индукцией каллусогенеза. В первые недели культивирования наблюдали развитие побегов нормальной морфологии светло-зелёной окраски. Через месяц происходили нарушения в развитии побегов, часть хвоинок сильно увеличивались в размерах, окраска изменялась на зеленовато-бурую. При этом наблюдали постепенное побурение фрагментов каллуса с образованием вкраплений светло-зелёной окраски.

В целом высокие концентрации 2,4-Д (1 и 2 мг/л) способствовали ускорению развития каллусов и приводили к более быстрому их побурению. Напротив, при снижении концентрации до 0,5 мг/л каллусы длительное время оставались зелёными без признаков побурения, росли медленнее, и в ряде случаев их удавалось поддерживать путём помещения на свежие среды в течение более длительного времени – до 4 месяцев.

В весенне-летний период при снижении концентрации регуляторов роста (2,4-Д до 0,5 мг/л, БАП до 0,5 мг/л) на питательных средах того же состава происходило развитие гетерогенных каллусов, состоящих из рыхлых и плотных массивов клеток, на которых примерно через 3 недели культивирования начинали расти структуры ярко-зелёного цвета, напоминающие верхушки хвоинок (рис. 3, А; Б). Стеблевая часть побега разрасталась плотной каллусной тканью красноватой окраски вследствие синтеза и накопления клетками антоцианов. Такие каллусы иногда удавалось культивировать довольно долго, иногда до нескольких месяцев. Затем начинался некроз ткани, со временем распространявшийся на весь побег. По-видимому, среда с концентрацией 2,4-Д и БАП по 0,5 мг/л является оптимальной для каллусообразования объекта исследований.

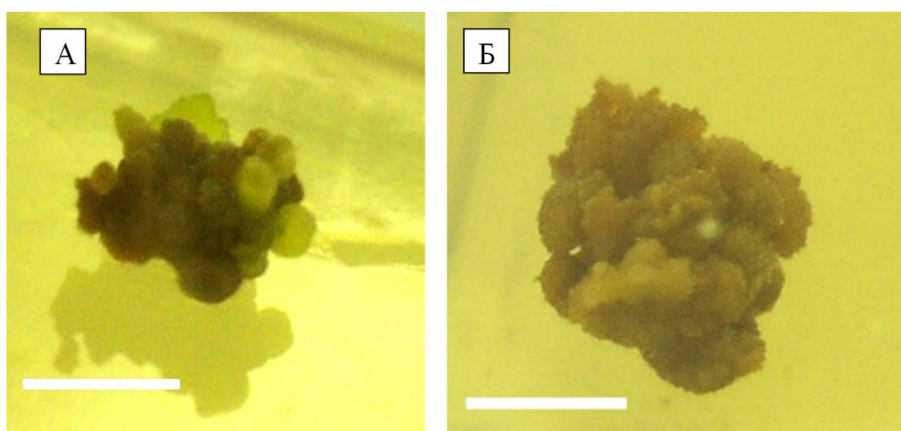


Рис. 1. Развитие каллуса из апикальных побегов пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.): А, Б – отдельные каллусы, полученные из эксплантов, которые культивировали в течение 4–6 недель на среде с 0,5 мг/л 2,4-Д, 5 мг/л БАП. Масштабный отрезок – 3 мм

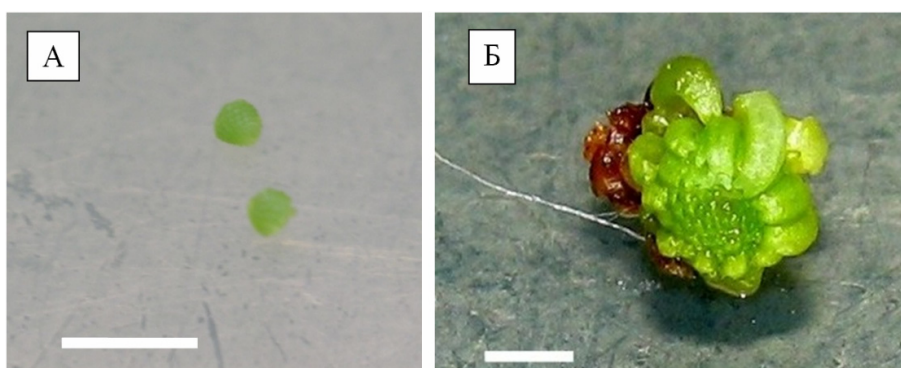


Рис. 2. Рост апикальных побегов пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.) на среде с 2,4-Д 1 мг/л и БАП 10 мг/л: А – исходные апикальные почки, изолированные из побегов перед началом культивирования на питательной среде; Б – развитие побегов на среде в течение 6 недель культивирования. Масштабный отрезок – 3 мм

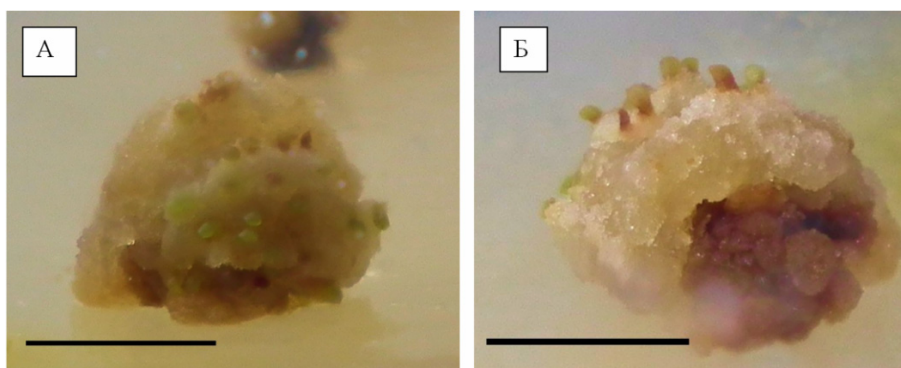


Рис. 3. Развитие каллуса пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.) на среде, содержащей 2,4-Д 0,5 мг/л и БАП 0,5 мг/л; период культивирования 1 месяц (А, Б – отдельные каллусы). Масштабный отрезок – 5 мм

На среде, где концентрация БАП в десять раз превышала концентрацию 2,4-Д (2,4-Д 0,5 мг/л, БАП 5 мг/л), чаще наблюдалось более активное развитие побега, увеличение хвоинок по сравнению с образованием каллусной массы (рис. 4, А; Б). Объекты имели мелкие размеры и очень яркую окраску, что, возможно, обусловлено влиянием избытка цитокининов, которые способствуют активизации фотосинтетического аппарата через влияние на накопление пигментов, хлоропластных белков и активизации фотосинтетических ферментов [3]. Однако впоследствии такие экспланты начинали быстро буреть, наблюдался обширный некроз, что приводило к гибели. В дальнейшем представляет интерес добиться роста и образования новых регенерантов побегов, а затем их укоренения, как это было выполнено на растениях можжевельника сибирского [1]. В последнем случае также была использована среда MS с добавлением 30 г/л сахарозы, пиридоксина, тиамина, никотиновой кислоты по 1 мг/л. Авторы отмечают, что оптимальным для образовавшихся побегов было использование невысокой концентрации БАП – 0,1 мг/л.

На среде MS с содержанием 2,4-Д 5 мг/л и БАП 0,5 мг/л побеги вначале имели зелёную окраску (рис. 5, А), затем по мере развития бледнели, другие побеги при разрастании сначала образовывали крупный богатый антоцианами каллус красно-бурого цвета, который по консистенции был значительно более плотным (рис. 5, Б). Иногда это происходило после переноса эксплантов на питательную среду McCown'a, в которую добавляли тиамин 0,5 мг/л; пиридоксин 0,5 мг/л; никотиновую кислоту 0,5 мг/л; глицин, миоинозит; пептон в указанных концентрациях, а также 2,4-Д 5 мг/л и БАП 0,5 мг/л. Со временем (начиная с 6 недель) начинал активно образовываться каллус рыхлой консистенции. К двум месяцам культивирования весь побег представлял собой каллусную ткань беловато-зелёного цвета, на поверхности которой были видны небольшие зоны красновато-бурой окраски. Такая культура оставалась жизнеспособной примерно в течение трёх месяцев культивирования. Примерно такое же соотношение ауксинов и цитокининов в среде было использовано для индукции каллусогенеза в экспериментах с эфедрой односемянной другими авторами: из верхушек молодых побегов наиболее активно каллус образовывался на среде MS с содержанием НУК 2,5 мг/л и БАП 0,15 мг/л [5].

На среде MS с одинаково высоким содержанием 2,4-Д и БАП по 5 мг/л развитие каллуса происходило так же, как на среде, содержащей 2,4-Д 5 мг/л и БАП 0,5 мг/л. Эксплант в начале культивирования (примерно до 1 мес.) представлял собой увеличенный в размерах короткий побег, набухали хвоинки, приобретая ярко-зелёный цвет. Существенное отличие имелось только в размерах (рис. 6). Эти каллусы были значительно крупнее, у них наблюдали более быстрый рост хвоинок. Через 3–4 недели культивирования происходила дедифференцировка клеток экспланта и образование каллусов желтоватого цвета, которые легко распадались на отдельные фрагменты. Базальная часть разрасталась плотной красноватой клеточной массой, небольшой по объёму.



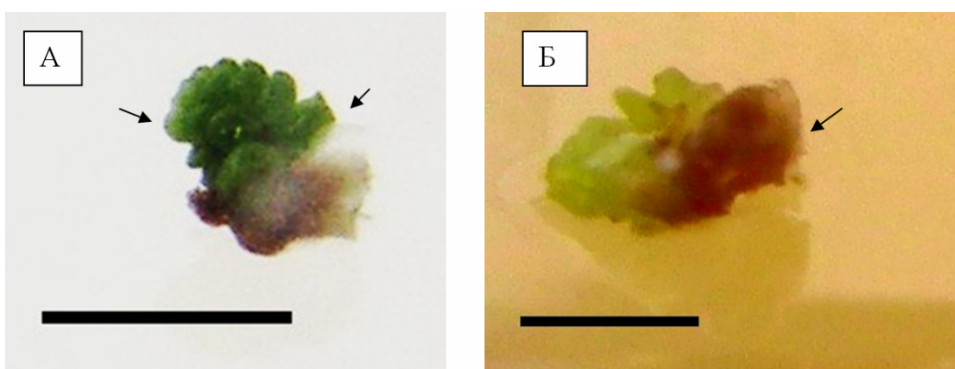


Рис. 4. Развитие эксплантов верхушечной почки пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.) на среде с содержанием 2,4-Д 0,5 мг/л и БАП 5 мг/л: А – стрелками указаны набухшие хвоинки. Возраст – 4 недели. Б – стрелкой указана зона развития пигментации стеблевых частей побегов. Период культивирования 5 недель. Масштабный отрезок – 5 мм

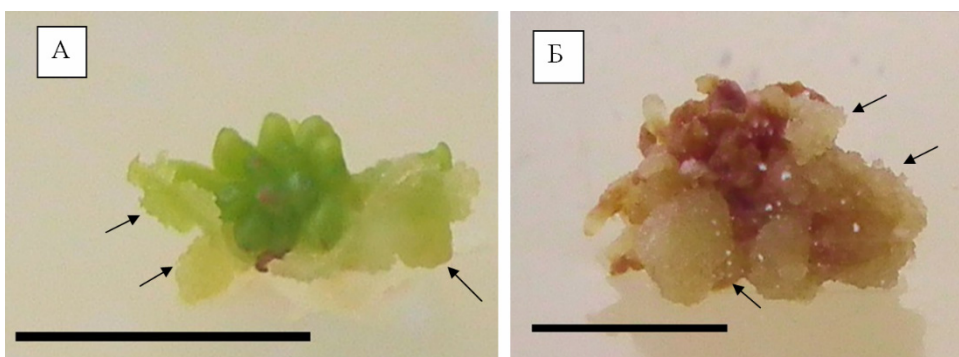


Рис. 5. Развитие эксплантов пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.) на среде с 2,4-Д 5 мг/л и БАП 0,5 мг/л. Стрелками отмечены места образования каллуса: А – Период культивирования 1 месяц. Б – Период культивирования 1,5 месяца. Масштабный отрезок – 5 мм

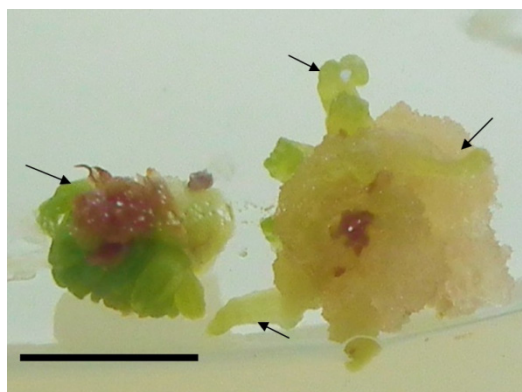


Рис. 6. Развитие эксплантов пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.) на среде с 2,4-Д 5 мг/л и БАП 5 мг/л. Стрелками указаны увеличенные хвоинки. Период культивирования 4 недели. Масштабный отрезок – 5 мм

Установлено, что оптимальные условия культивирования могут различаться в зависимости от экспланта и цели экспериментов (калусообразование, развитие морфогенных структур). Так, для культивирования незрелых зиготических зародышей пихты сибирской на начальных этапах формирования каллуса оптимальной была агаризованная среда LV с добавлением 2,4-Д в концентрации до 2 мг/л и БАП 1мг/л [2]. Но этот состав среды оказался непригоден для дальнейшего поддержания культуры. В наших экспериментах длительное культивирование апикальных эксплантов и калусогенез оказались возможными на среде MS с добавлением 2,4-Д и БАП в концентрациях 0,5–5 мг/л.

### **Заключение**

Устойчивость зрелых деревьев хвойных пород к вегетативному размножению является серьёзной проблемой клонального микроразмножения. В то же время отбор ценных генотипов для клонирования в перспективе целесообразно проводить среди высокопродуктивных экземпляров взрослых деревьев, показывающих хорошие ростовые характеристики, требуемые показатели древесины, а также декоративные качества. Поэтому, несмотря на значительные успехи современной биотехнологии, технологии клонального микроразмножения для ряда ценных хвойных пород остаются неразработанными, не решены фундаментальные проблемы морфогенеза [10].

В ходе проведённых нами экспериментов впервые были предприняты попытки введения в культуру *in vitro* растений пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.) путём использования в качестве первичных эксплантов вегетативных частей растений. Были разработаны и оптимизированы условия асептической обработки первичного экспланта и культивирования на питательной среде *in vitro*. В качестве исходного экспланта наиболее подходящими оказались апикальные почки, изолированные из асептически обработанных апикальных побегов в весенне-летний период. В ходе работы были определены оптимальные концентрации регуляторов роста для индукции калусогенеза и развития побегов из первичного экспланта, установлена сезонная зависимость культивирования каллусов пихты от времени года. В дальнейшем планируется получение морфогенных каллусов, способных к формированию соматических эмбриоидов пихты сибирской. Это позволит получать вегетативные клоны «плюсовых» деревьев с целью дальнейшего использования в озеленении и лесовосстановлении.

### **Список литературы**

1. Алёшина Е. Н. Регенерация *Juniperus sibirica* В. *in vitro* / Е. Н. Алёшина, Н. А. Величко // Хвойные бореал. зоны. – 2008. – № 3/4. – С. 333–336.
2. Бажина Е. В. Репродуктивный потенциал пихты сибирской в горах Западного Саяна и сохранение ее генофонда в культуре *in vitro* / Е. В. Бажина // Хвойные бореал. зоны. – 2012. – Т. 30, № 1/2. – С. 10–15.
3. Изучение функциональных свойств зеатин-связывающего белка, участвующего в гормонзависимой регуляции транскрипции хлоропластного генома / Т. В. Люкевич [и др.] // Физиол. раст. – 2002. – Т. 49, № 1. – С. 105–112.

4. Перспективы микроклонального размножения хвойных в культуре *in vitro* через соматический эмбриогенез / И. Н. Третьякова [и др.] // Хвойные бореал. зоны. – 2012. – Т. 30, № 1/2. – С. 180–186.
5. Плынская Ж. А. Культивирование в условиях *in vitro* / Ж. А. Плынская, Е. Н. Алёшина, Н. А. Величко // Хвойные бореал. зоны. – 2008. – Т. 15, № 1/2. – С. 68–71.
6. Салаяев Р. К. Получение каллусной культуры клеток кедр сибирского / Р. К. Салаяев, Н. И. Рекославская // Лесоведение. – 2009. – № 5. – С. 57–62.
7. Третьякова И. Н. Сохранение генофонда хвойных видов Сибири при помощи соматического эмбриогенеза *in vitro* – современного метода биотехнологии / И. Н. Третьякова, А. В. Барсукова // Хвойные бореал. зоны. – 2010. – Т. 27, № 1/2. – С. 203–206.
8. Третьякова И. Н. Индукция соматического эмбриогенеза у кедр сибирского / И. Н. Третьякова, М. В. Ижболдина // Лесоведение. – 2009. – № 5. – С. 43–49.
9. Klimaszewska K. Conifer somatic embryogenesis: I. Development / K. Klimaszewska, D. R. Cyr // Dendrobiology. – 2002. – Vol. 48. – P. 31–39.
10. Lelu-Walter M-A. Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis / M-A. Lelu-Walter, M. Bernier-Cardou, K. Klimaszewska // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 2008. – Vol. 92. – P. 31–45.
11. Lloyd G. Commercially-feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by shoot tip culture / G. Lloyd, B. H. McCown // Proc. Int. Plant Prop. Soc. – 1981. – N 30. – P. 421–427.
12. Malabadi R. B. Genetic transformation of Conifers: Applications in and Impacts on commercial Forestry / R. B. Malabadi, K. Nataraja // Transgenic plant Journal. – 2007. – Т. 1(2). – P. 289–313.
13. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture / T. Murashige, F. Scoog // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15, N 2 – P. 473–497.
14. The effect of different plant growth regulation on adventitious shoot formation from *Pinus virginiana* zygotic embryo / W. Tang [et al.] // Plant Cell Tiss. Organ Cult. – 2004. – Vol. 78. – P. 237–240.

## Peculiar Properties of the Process of Obtaining Tissue Cultures of *Abies sibirica* Ledeb.

A. V. Tretiyakova<sup>1,2</sup>, E. A. Demina<sup>3</sup>, N. I. Rekoslavskaya<sup>1,2</sup>,  
R. K. Salyaev<sup>1,2</sup>, A. S. Stolbikov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry SB RAS, Irkutsk

<sup>2</sup> Irkutsk State University, Irkutsk

<sup>3</sup> Tunka National Park, Buryat Republik

**Abstract.** The paper discusses the problem of obtaining tissue cultures of *Abies sibirica* Ledeb. *in vitro*. The vegetative shoots taken from aged trees were used as primary explants growing in Irkutsk and 70 km apart, in the countryside. Chosen were (i) the conditions of sterilization of shoot apices, (ii) the components of nutrient media to obtain tissue cultures. The explant type was chosen. Using the apical buds of the sprouts and the nutrient media characterized by varied proportions of growth regulators, we managed to optimize the growth and development conditions for the sprouts and callusogenesis in-

duction during the spring-summer season. The results obtained may be applied in further experiments, which presume obtaining morphogenic tissue cultures of *Abies sibirica* Ledeb., and also in the process of elaboration of the conditions for microclonal reproduction of valuable decorative forms of conifer trees. This elaboration was conducted to the end of landscaping and reforestation.

**Keywords:** *Abies sibirica* Ledeb., tissue cultures, tissue culture *in vitro*, microclonal propagation of conifers.

*Третьякова Анастасия Валерьевна*  
кандидат биологических наук  
научный сотрудник, доцент  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132  
тел. (3952) 42-46-59  
факс (3952) 51-07-54  
Иркутский государственный университет  
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
тел. (3952) 24-18-55  
e-mail: anastasiya\_chepi@mail.ru

*Tretyakova Anastasiya Valeryevna*  
Candidate of Sciences (Biology)  
Research Scientist, Assistant Professor  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033  
tel. (3952) 42-46-59  
fax (3952) 51-07-54  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003  
tel. (3952) 24-18-55  
e-mail: anastasiya\_chepi@mail.ru

*Демина Екатерина Александровна*  
научный сотрудник  
Национальный парк «Тункинский»  
671010, Бурятия, Тункинский район,  
с. Кырен, ул. Ленина, 69  
тел./факс 8(30147)41-301  
e-mail: piridoksin@mail.ru

*Demina Ekaterina Alexandrovna*  
Research Scientist  
Tunka National Park  
69, Lenin st., Kyren settl., Buryat  
Republic, 671010  
tel./fax: 8(30147)41-301  
e-mail: piridoksin@mail.ru

*Рекославская Наталья Игоревна*  
доктор биологических наук, профессор,  
главный научный сотрудник  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132  
тел. (3952) 42-46-59  
факс (3952) 51-07-54  
Иркутский государственный университет  
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
e-mail: rekoslavskaya@sifibr.irk.ru  
тел. (3952) 24-18-55

*Rekoslavskaya Nataliya Igorevna*  
Doctor of Sciences (Biology),  
Chief Research Scientist, Professor  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033  
tel.: (3952) 42-46-59  
fax: (3952) 51-07-54  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003  
e-mail: rekoslavskaya@sifibr.irk.ru  
tel.: (3952) 24-18-55

*Салаяев Рюрик Константинович*  
доктор биологических наук, профессор,  
чл.-корр. РАН, советник РАН  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132  
тел. (3952) 42-46-59

*Salyaev Ryurik Konstantinovich*  
Doctor of Sciences (Biology), Professor,  
Corresponding Member for RAS, Advisor  
for RAS  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,

*факс (3952) 51–07–54  
Иркутский государственный университет  
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
тел.: (3952) 24–18–55  
e-mail: salyaev@sifibr.irk.ru*

*tel.: (3952) 42–46–59  
fax: (3952) 51–07–54  
Irkutsk State University  
tel.: (3952) 24–18–55  
e-mail: salyaev@sifibr.irk.ru*

*Столбиков Алексей Сергеевич  
кандидат биологических наук  
научный сотрудник, 0 инженер  
Сибирский институт физиологии  
и биохимии растений СО РАН  
664033, г. Иркутск, ул. Лермонтова, 132  
тел.: (3952) 42–46–59  
факс: (3952) 51–07–54  
Иркутский государственный университет  
664003, г. Иркутск, ул. К. Маркса, 1  
тел.: (3952) 24–18–55  
e-mail: valkir5@yandex.com*

*Stolbikov Aleksey Sergeevich  
Candidate of Sciences (Biology)  
Research Scientist, Engineer  
Siberian Institute of Plant Physiology  
and Biochemistry SB RAS  
132, Lermontov st., Irkutsk, 664033,  
tel.: (3952) 42–46–59  
fax: (3952) 51–07–54  
Irkutsk State University  
1, K. Marx st., Irkutsk, 664003  
tel. (3952) 24–18–55  
e-mail: valkir5@yandex.com*