

УДК 581.143.6: 582.475.4

## Особенности развития соматических зародышей у сибирских сосен на стадии синхронизации и созревания

### Peculiarities of the somatic embryos development of Siberian pines at the stage of synchronization and maturation

Носкова М. А.<sup>1,2</sup>, Носкова Н. Е.<sup>2</sup>, Акиненко М. А.<sup>1,2</sup>

Noskova M. A.<sup>1,2</sup>, Noskova N. E.<sup>2</sup>, Akinenko M. A.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Сибирский федеральный университет, Институт фундаментальной биологии и биотехнологии, г. Красноярск, Россия. E-mail: masha\_nosk@mail.ru, aksn2008@gmail.com

<sup>2</sup> Лаборатория биотехнологии с/х и лесных культур, Красноярский государственный аграрный университет, г. Красноярск, Россия. E-mail: noscova62@mail.ru

<sup>1</sup> Siberian Federal University, School of Fundamental Biology and Biotechnology, Krasnoyarsk, Russia

<sup>2</sup> Laboratory of biotechnology of crop and forest species, Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk, Russia

**Реферат.** В данной работе рассматриваются особенности развития соматических зародышей сосны обыкновенной, сосны сибирской и кедрового стланика на стадии синхронизации и созревания. Исследованы изменения морфолого-анатомических характеристик эмбриогенных масс данных видов в присутствии абсцизовой и/или гиббереллиновой кислоты и без регуляторов роста на твердых средах и в жидких системах (в суспензии или с использованием впитывающих материалов). Определены оптимальные условия синхронизации и созревания эмбриогенных масс, а также установлены факторы, негативно влияющие на созревание соматических зародышей.

**Summary.** In this work, the development features of *Pinus sylvestris*, *P. sibirica* and *P. pumila* somatic embryos at the synchronization and maturation stage were considered. Changes in the morphologic anatomical characteristics of the embryogenic masses of these species in the presence of abscisic and/or gibberellic acid and without growth regulators on solid media or in liquid systems (in suspension or using absorbent materials) have been studied. Optimal conditions for synchronization and maturation of embryogenic masses and factors that negatively affected the maturation of somatic embryos were determined.

*Pinus sylvestris* L., *P. sibirica* Du Tour, *P. pumila* (Pall.) Regel – образователи лесов Сибири и Дальнего Востока, эдификаторы растительного покрова. Они имеют огромное биосферное значение, являются хозяйственно значимыми и экономически важными видами.

В последнее время наблюдается большой интерес к использованию биотехнологических методов размножения данных видов, в частности, путем соматического эмбриогенеза. Соматический эмбриогенез – это получение *de novo* структур, подобных зиготическим зародышам, из организованных тканей либо из каллусов. Соматический эмбриогенез представляет собой уникальную модельную систему для исследования различных физиологических процессов, факторов, влияющих на морфогенез и развитие зародыша. С помощью соматического эмбриогенеза можно изучать развитие морфогенетических программ (индукция, пролиферация, детерминация, дедифференциация и дифференциация), проводить молекулярные исследования (Митрофанова, 2009; Барсукова, 2011).

Соматический эмбриогенез у хвойных проходит в несколько стадий (Klimaszewska, Cyr, 2002; Gupta et al., 2011):

- инициация – образование из эксплантов на питательных средах в присутствии регуляторов роста растений эмбриогенных культур, состоящих из проэмбриональных структур (РЕМ I – РЕМ III), а также ранних соматических зародышей;
- пролиферация – сохранение непрерывного роста и размножения эмбриогенных масс со становлением стабильных эмбриогенных линий;

- созревание – развитие незрелых соматических зародышей в процессе дифференциации с формированием семядолей, гипокотилия, точек роста побега и корня;
- прорастание соматических зародышей;
- ранний посткультуральный рост – адаптация в условиях теплицы.

В процессе соматического эмбриогенеза пролиферирующие эмбриогенные массы перед помещением на среды для созревания подвергают синхронизации – предобработке, в ходе которой пролиферация масс прекращается и из проэмбриогенных структур развиваются глобулы соматических зародышей (СЗ) с хорошо развитыми суспензорами, способные к дифференциации в семядольные зародыши (Lelu-Walter et al., 2008; Carneros et al., 2009; Gupta et al., 2011).

Целью данной работы было исследовать особенности развития соматических зародышей у сибирских сосен на стадии синхронизации и созревания.

В качестве объекта исследования использовали эмбриогенные массы стабильно пролиферирующих линий *P. sylvestris* СОАЛСП41.2014, *P. pumila* КСТНЧ24.2011 и *P. sibirica* ССК5.2012, полученные в ЛБ СХиЛК Красноярского ГАУ.

Предобработку (синхронизацию) эмбриогенных масс проводили на стандартных средах (1/2LV (Litvay et al., 1985) с добавлением активированного угля (250 мг/л) и гелрита (1,6 г/л) в присутствии абсцизовой (АБК, 10 мг/л) и/или гиббереллиновой кислоты (ГК, 10 мг/л) и без регуляторов роста на твердых средах и в жидких системах – в виде суспензии или с использованием ватных дисков в качестве впитывающих материалов (табл.). Каждый вариант опыта был выполнен в пяти повторностях.

Таблица

Варианты эксперимента

Система \ Регулятор Роста	Без регуляторов роста, БГ	Абсцизовая кислота, А	Абсцизовая и гибберелловая кислота, АГ
Т – твердая среда	ТБГ	ТА	ТАГ
Ж – жидкая среда, суспензия,	ЖБГ	ЖА	ЖАГ
В – жидкая среда, ватные диски,	ВБГ	ВА	ВАГ

Эксперимент проводили в темноте при температуре  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Варианты на твердой среде и в жидких системах на ватных дисках помещали в условия термостата, в суспензиях – культивировали на шейкере. Экспозиция на средах без регуляторов роста составила 1 неделю, на средах с добавлением АБК и ГК – 2 недели (Lelu-Walter et al., 2008; Carneros et al., 2009; Gupta et al., 2011).

После предобработки эмбриогенные массы (200–300 мг) суспендировали в 4–5 мл жидкой среды без органических составляющих и регуляторов роста, фильтровали на стерильную мембрану, удаляя раствор из эмбриональной массы с помощью вакуумного насоса, и помещали на твердую среду для созревания в присутствии АБК (20 мг/л) и активированного угля (1 г/л). Часть кластеров переносили на среду для созревания в неизменном виде, не подвергая суспендированию. Созревание СЗ проводили на твердой среде (1/2 LV) в присутствии АБК (20 мг/л) и активированного угля (1 г/л) (Lelu-Walter et al., 2008; Carneros et al., 2009). Культуры выдерживали в темноте в условиях термостата при температуре  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Экспозиция эмбриогенных масс на среде для созревания составила 3–6 мес.

В ходе исследования отслеживали внешнее состояние эмбриогенных масс, зрелость и аномалии эмбриогенных структур, количество проэмбриогенных структур (РЕМ III) и головок соматических зародышей и их соотношение, наличие и длину суспензоров – на микропрепаратах. Морфолого-анатомические характеристики эмбриогенных масс определяли с помощью микроскопирования и фиксировали с помощью цифровой фотокамеры Canon PowerShot A640 PC1200. Статистический анализ проводился согласно принятым методам, на базе ПК с использованием стандартного пакета анализа Microsoft Excel 2007.

Исследования показали, что у кедрового стланика еще до эксперимента эмбриогенные массы состояли из хорошо развитых глобул СЗ – прозрачных с длинными суспензорами и крупными голов-

ками. В ходе синхронизации в жидких системах головки СЗ у стланика становились еще крупнее, а суспензоры, наоборот, короткими и рыхлыми. На твердых средах СЗ достигали наибольших размеров и были представлены мощными суспензорами и крупными непрозрачными глобулами, готовыми к дифференциации. АБК и ГК не оказали сколько-нибудь заметного влияния на развитие СЗ. Наиболее эффективные условия предобработки эмбрионной ткани оказались в варианте без регуляторов роста, где формировались самые большие СЗ, которые при приготовлении микропрепаратов сильно раздавливались.

У сосны обыкновенной и сосны сибирской в эксперименте по синхронизации морфолого-анатомические характеристики эмбрионных масс в разных вариантах опыта были схожи и проявляли одинаковые тенденции в развитии. Так, в жидких системах у обоих видов эмбрионные массы характеризовались большим количеством РЕМ III, по сравнению с регенерирующими на них головками СЗ. Суспензоры не развивались или были короткими. Исключение составила сосна обыкновенная в варианте ВА, где единично, но формировались и более длинные суспензоры. На твердой среде эмбрионные массы состояли также, главным образом, из РЕМ III, на которых регенерировали меристематические массивы и глобулы СЗ. Гормональный фон в разных вариантах опыта не оказывал заметного влияния на качественные характеристики эмбрионных структур. Наиболее хорошо развитые длинные суспензоры были отмечены в варианте без регуляторов роста, в особенности в эмбрионных массах сосны обыкновенной.

Соотношение эмбрионных структур в разных вариантах опыта по синхронизации проводили на примере сосны обыкновенной. Во всех вариантах эксперимента эмбрионные массы продолжали активно пролиферировать и за время экспозиции увеличили свой объем в 2–3 раза. Количество СЗ в массах в разных вариантах увеличилось до 25,9–83,3 %, однако доля структур РЕМ оставалась значительной (рис.). Наиболее эффективные условия предобработки эмбрионной ткани оказались в варианте опыта на твердой среде без добавления регуляторов роста, когда формировалось наибольшее количество хорошо развитых глобулярных СЗ с длинными суспензорами. Следует отметить, что на твердой среде во всех случаях количество глобулярных СЗ было выше, чем в жидких системах. В жидких системах, независимо от наличия или отсутствия впитывающего материала, количество СЗ и РЕМ оказалось примерно одинаковым, за исключением вариантов без регуляторов роста, где на ватном диске образовалось глобул СЗ вдвое больше, чем в суспензии. Использование АБК в составе среды в жидких системах стимулировало образование глобул СЗ, количество которых статистически незначимо отличалось от количества таковых в варианте с использованием твердой среды (ТА). Использование АБК и ГК одновременно оказало слабое влияние на развитие глобулярных СЗ из РЕМ.

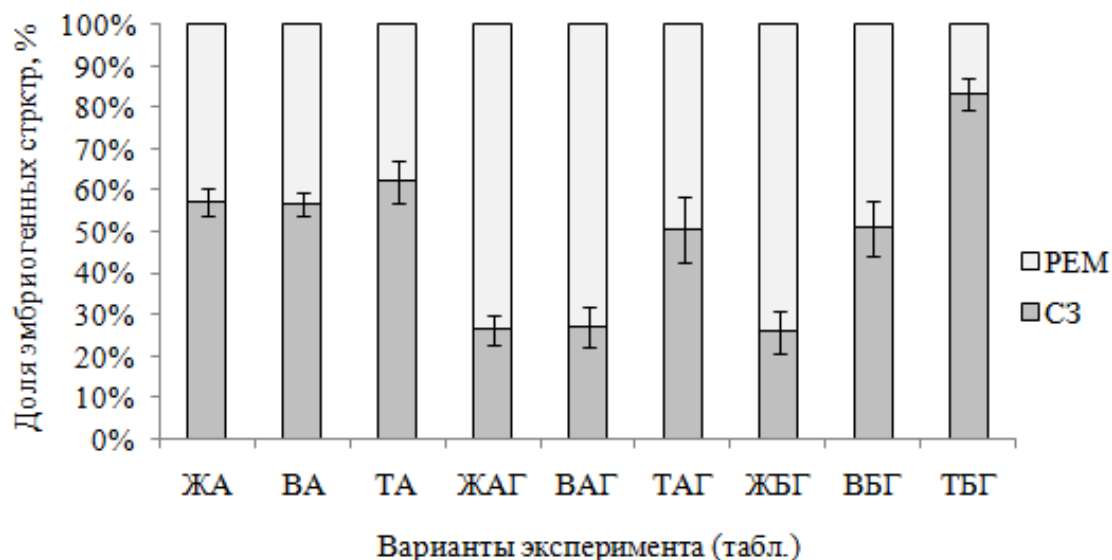


Рис. Соотношение эмбрионных структур в вариантах предобработки: РЕМ – структуры проэмбриональной массы; СЗ – глобулы соматических зародышей.

Двухфакторный дисперсионный анализ показал, что «система среды» (твердая, суспензия, жидкая с использованием ватного диска в качестве впитывающего материала), а также наличие или отсутствие в составе среды регуляторов роста представляют собой факторы, оказывающие достоверно значимое влияние на образование глобул СЗ (сила влияния факторов 17,8 и 12,9 соответственно). Однако при одновременном взаимодействии этих факторов сила влияния заметно снижается (10,0).

В ходе эксперимента по созреванию исследования показали, что обводнение культур из-за недостаточного удаления влаги из эмбриогенных масс при трансплантации на среды для созревания препятствовало дифференциации и созреванию СЗ.

В хорошо «подсушенных» эмбриогенных массах в варианте опыта после предобработки на твердой среде без добавления регуляторов роста через 3–5 месяцев происходило формирование семядольных СЗ у кедрового стланика – в массовом количестве, у сосны обыкновенной – единично. У сосны сибирской зародыши не созревали, а эмбриогенные массы продолжали пролиферировать.

Научной практике известны виды хвойных, «проблемные» для получения соматического эмбриогенеза (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, *Pinus sylvestris* и др.), у которых часто эмбриогенные линии не способны дифференцировать нормальные зрелые СЗ. Недавними исследованиями было установлено, что преобразование проэмбриогенных структур в соматические зародыши связано с особенностями содержания эндогенных гормонов и полиаминов (Farias-Soares et al., 2014) и что в проблемных клеточных линиях устанавливается непрерывный цикл дегенерации ранних СЗ и дифференциация новых (Abrahamsson et al., 2017).

Таким образом, были изучены особенности развития соматических зародышей у сибирских видов рода *Pinus* на стадии синхронизации и созревания. Было выявлено, что наибольшее количество хорошо развитых глобулярных соматических зародышей с длинными суспензорами формировались при синхронизации на твердой среде без добавления регуляторов роста. Максимально возможное обезвоживание эмбриогенной массы при трансплантации на среды для созревания является необходимым условием для созревания соматических зародышей. Установлены факторы, негативно влияющие на созревание СЗ: обводнение культур, продолжающаяся пролиферация эмбриогенных масс. Было выявлено, что получение дифференциации и созревания СЗ у сосны обыкновенной и сосны сибирской затруднено и требует дополнительных исследований.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Барсукова А. В.** Регуляция соматического эмбриогенеза у видов лиственницы в культуре *in vitro* : автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Красноярск, 2011. – 19 с.
- Митрофанова И. В.** Соматический эмбриогенез как система *in vitro* размножения культурных растений // Физиология и биохимия культ. растений, 2009. – Т. 41, № 6. – С. 496–508.
- Abrahamsson M., Valladares S., Merino I., Larsson E., von Arnold S.** Degeneration pattern in somatic embryos of *Pinus sylvestris* L. // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant, 2017. – Vol. 53, № 2. – P. 86–96.
- Carneros E., Celestino C., Klimaszewska K., Park Y.-S., Toribio M., Bonga J. M.** Plant regeneration in Stone pine (*Pinus pinea* L.) by somatic embryogenesis // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2009. – Vol. 98, № 2. – P. 165–178.
- Farias-Soares F. L., Steiner N., Schmidt E. C., Pereira M. L. T., Rogge-Renner G. D., Bouzon Z. L., Floh E. I. S., Guerra M. P.** The transition of proembryogenic masses to somatic embryos in *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze is related to the endogenous contents of IAA, ABA and polyamines / Acta Physiol Plant, 2014. – Vol. 36, № 7. – P 1853–1865.
- Gupta P. K., Holmstrom D., Larson B.** Methods for producing a synchronized population of conifer somatic embryos // Patent US 7888099 B2, grant. – № US 10/636,081; 06.08.2003; 15.02.2011. – 9 p.
- Klimaszewska K., Cyr D. R.** Conifer somatic embryogenesis: I. Development // Dendrobiology, 2002. – Vol. 48. – P. 31–39.
- 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 Tissue and Organ Cultures, 2008. – Vol. 92, № 1. – P. 31–45.
- Litvay J. D., Verma D. C., Johnson M. A.** Influence of a loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.) // Plant Cell Rep, 1985. – Vol. 4, № 6. – P. 325–328.