

УДК 581.143.6:582.475

## Особенности ранних стадий соматического эмбриогенеза ели голубой в культуре *in vitro*

### Peculiarities of early stages of *Picea pungens* somatic embryogenesis *in vitro*

Воронкова М. С., Несмелова Л. А., Железниченко Т. В.

Voronkova M. S., Nesmelova L. A., Zheleznichenko T. V.

ФГБУН «Центральный сибирский ботанический сад СО РАН», г. Новосибирск, Россия. E-mail: bmc\_87@mail.ru

Central Siberian Botanical Garden of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

**Реферат.** Исследованы ранние стадии соматического эмбриогенеза ели голубой (*Picea pungens* Engelmann). Установлены способность трансформации соматических клеток в эмбриональные структуры и особенность пролиферации соматических зародышей в зависимости от генотипа растения-донора и этапа онтогенеза эксплантов (зиготических зародышей). Также выявлено влияние минерального состава питательной среды, антиоксидантов (аскорбиновой кислоты и глутатиона) на процесс соматического эмбриогенеза ели голубой.

**Summary.** Early stages of somatic embryogenesis of *Picea pungens* Engelmann were studied. The ability of transformation of somatic cells into embryonic structures and the peculiarity of somatic embryo proliferation depending on the genotype of the donor plant and the stage of explant ontogenesis (zygotic embryos) were established. The influence of the mineral composition of nutrient medium, antioxidants (ascorbic acid and glutathione) on the process of somatic embryogenesis of *Picea pungens* was revealed.

*Picea pungens* Engelmann – ель голубая или колючая () представляет большой интерес как культура для городского озеленения, поскольку отличается высокими декоративными свойствами, а также нетребовательна к условиям произрастания. *Picea pungens* устойчива к воздушным загрязнениям, холоду и засухе.

При естественном воспроизводстве ели голубой возникает ряд сложностей. В фазу репродуктивной зрелости представители этого вида вступают довольно поздно. Взрослые деревья характеризуются неравномерностью урожая. При семенном размножении в большинстве случаев декоративные признаки материнского растения не передаются или передаются незначительно (Стам, 1984), а при вегетативном способе нередко передаются болезни от взрослых особей (Savella, 1965). Следовательно, традиционные методы не решают задач размножения элитных форм, в связи с этим необходимо прибегать к использованию биотехнологических подходов.

Соматический эмбриогенез (СЭ) представляет собой быстрый и крупномасштабный способ размножения генотипов хвойных (Gupta et al., 1991; Tautorus et al., 1991). Однако регенерация ели голубой через соматический эмбриогенез является по-прежнему актуальной.

Цель исследования заключалась в изучении особенностей инициации и пролиферации соматического эмбриогенеза *Picea pungens* в культуре *in vitro*.

Эксплантами служили изолированные зиготические зародыши, отобранные на этапе позднего эмбриогенеза и на стадии зрелого зародыша с трех генотипов деревьев-доноров. Материал собирали со свободноопыленных деревьев, произрастающих в искусственных насаждениях г. Новосибирска, с начала июля по начало сентября. Стерилизацию семян проводили 10 % раствором  $H_2O_2$  в течение 10 мин., затем однократно промывали стерильной водой в течение 10 мин. Семена очищали от покровных чешуй в асептических условиях. Инициацию СЭ проводили на базовых средах  $\frac{1}{2}$  DCR (Gupta, 1985) и  $\frac{1}{2}$  LV (Litvay, 1985) с добавлением аскорбиновой кислоты (0–300 мг/л) и/или глутатиона (0–300 мг/л). В качестве регуляторов роста на этапе инициации СЭ использовали 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) – 2 мг/л и 6-бензоаминопурин (6-БАП) – 1 мг/л. Переход к пролиферации регулировали снижением уровня 6-БАП до 0,5 мг/л. На стадии инициации СЭ содержание сахарозы в среде состав-

ляло 30 г/л, на этапе пролиферации – 20 г/л. Культуры инкубировали в темноте, при  $24 \pm 2$  °С. Цитологический контроль проводили методом давленных препаратов. Небольшие кусочки каллуса окрашивали водным раствором сафранина, добавляли каплю глицерина и накрывали покровным стеклом. Цитоэмбриологический анализ препаратов проводили с помощью световых микроскопов Carl Zeiss Axiolab A. и Axioskop-40 с цветными цифровыми камерами высокого разрешения AxioCam MRc-5 и программой AxioVision 4.8 для получения, обработки и анализа изображений (Carl Zeiss, Германия) в Центре коллективного пользования Центрального Сибирского ботанического сада (ЦКП ЦСБС СО РАН). Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам, используя Microsoft Excel 2003.

Проанализирована способность к трансформации соматических клеток в эмбриональные структуры в зависимости от генотипа растения и этапа онтогенеза зиготических зародышей, выявлено влияние минерального состава питательной среды, аскорбиновой кислоты и глутатиона на процесс соматического эмбриогенеза ели колючей. Установлено, что стадия развития экспланта, а также генотип растения и состав питательной среды влияют на образование соматических зародышей.

Морфогенный ответ незрелых зиготических зародышей, инокулированных на питательные среды на этапе позднего эмбриогенеза (стадия инициации семядолей), проявлялся только на питательной среде  $\frac{1}{2}$  LV и варьировал от 5 до 50 % в зависимости от генотипа дерева и содержания/отсутствия в питательной среде аскорбиновой кислоты и глутатиона. Однако цитоэмбриологический анализ не показал присутствие эмбриогенных структур в биомассе каллуса.

Инициация каллусогенеза наиболее эффективно происходила при введении в культуру *in vitro* незрелых зиготических зародышей со сформировавшимися семядолями. При использовании среды  $\frac{1}{2}$  DCR инициация каллусогенеза была выше, чем при применении  $\frac{1}{2}$  LV и колебалась в пределах 85–100 %, однако на среде  $\frac{1}{2}$  LV доля эмбриогенных каллусов была выше, особенно при добавлении к среде аскорбиновой кислоты и достигала 28 %. Морфологические характеристики каллуса, образовавшегося на разных средах, различались. На среде  $\frac{1}{2}$  DCR часто наблюдалось формирование плотного каллуса, который затем темнел и погибал. В связи с этим анализировали каллус, полученный только на питательной среде  $\frac{1}{2}$  LV.

Цитоэмбриологический анализ первичного каллуса, полученного на питательной среде  $\frac{1}{2}$  LV, при введении в культуру незрелых зиготических зародышей на этапе сформированных семядолей показал, что в каллусах всех исследованных генотипов наблюдались соматические зародыши на ранней и поздней глобулярной стадии. Пролиферация эмбрионально-суспензорной массы (ЭСМ) при культивировании каллуса, полученного из незрелых зиготических зародышей, происходила только у одного из трех исследованных генотипов. Морфологические, онтогенетические и количественные характеристики соматических зародышей различались в зависимости от состава среды инициации и пролиферации соматического эмбриогенеза. Культивирование каллусов на средах, не содержащих аскорбиновую кислоту, приводило к формированию в нем зародышей, находящихся на ранней глобулярной стадии развития соматических зародышей. Культивирование каллусов с аскорбиновой кислотой на этапе инициации и при ее отсутствии на этапе пролиферации приводило к образованию соматических зародышей на поздней глобулярной стадии, однако их количество было немногочисленным. Культивирование каллусов с аскорбиновой кислотой как на этапе инициации, так и на этапе пролиферации приводило к асинхронности развития зародышей, и в каллусной массе присутствовали соматические зародыши как на ранней, так и на поздней глобулярной стадии. Применение глутатиона приводило либо к замедлению онтогенетического развития соматических зародышей, либо к их деградации.

При введении в культуру зрелых зиготических зародышей морфогенный ответ был довольно высок и находился в пределах 70–100 %, а доля эмбриогенного каллуса составляла от 2 до 8 % в зависимости от состава питательной среды. При цитоэмбриологическом анализе иницирующегося каллуса, сформированного из зрелых зиготических зародышей, в нем наблюдалось наличие удлиненных асимметрично-делящихся клеток ЭСМ (рис. 1а). ЭСМ, сформированная из зрелых зиготических зародышей, была способна к пролиферации, и при цитологическом анализе наблюдали присутствие соматических зародышей на поздней глобулярной стадии (рис. 1б).

Таким образом, установлено, что стадия развития зиготических зародышей влияет на образование ЭСМ. Наиболее активная индукция ЭСМ *Picea pungens* происходила из незрелых зиготических зародышей, инокулированных на питательную среду  $\frac{1}{2}$  LV, содержащую аскорбиновую кислоту, в кон-

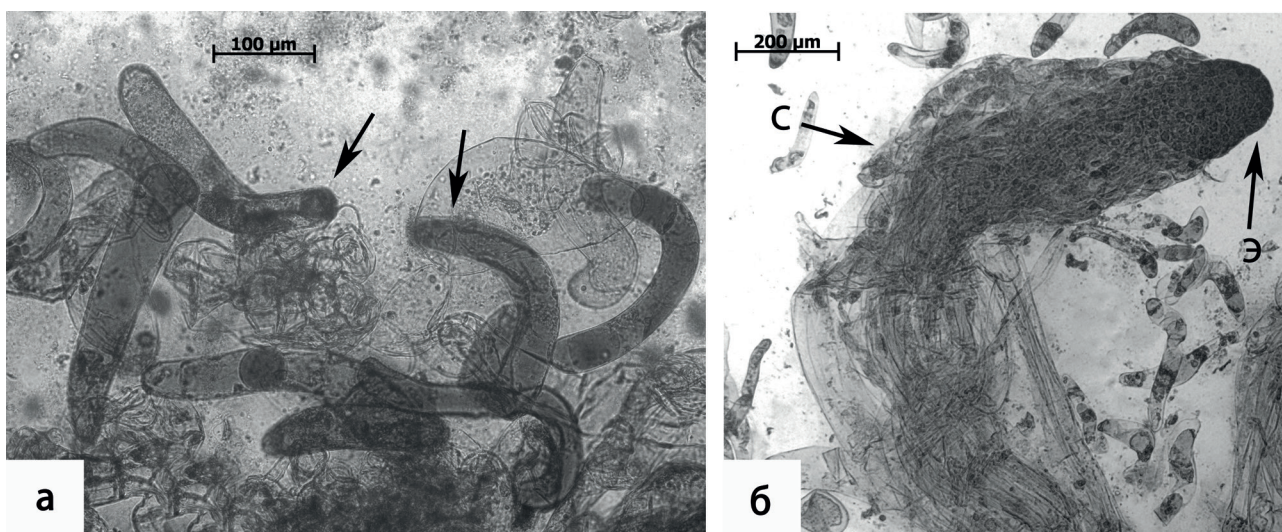


Рис.1. Индукция соматического эмбриогенеза *Picea pungens*: а – асимметричное деление клеток эмбрионально-суспензорной массы (масштаб: 100 мкм); б – соматические зародыши на глобулярной стадии: э – эмбриональная масса, с – суспензорная система (масштаб: 200 мкм).

це позднего эмбриогенеза на стадии сформированных семядолей. Инокуляция зрелых зиготических зародышей была менее эффективной. Аскорбиновая кислота и глутатион влияют на морфологию и развитие соматических зародышей. Внесение аскорбиновой кислоты стимулировало формирование ЭСМ при инициации СЭ и способствовало онтогенетическому развитию глобулярных зародышей на этапе пролиферации. Добавление глутатиона в среду увеличивало частоту образования ЭСМ на этапе инициации, но тормозило развитие соматических зародышей и даже приводило к их деградации на стадии пролиферации. Получена ЭСМ из зиготических зародышей ели колючей, способная пролиферировать и продуцировать соматические зародыши. ЭСМ ели колючей представлена двумя типами клеток: удлиненными эмбриональными трубками и изодиаметрическими эмбриональными инициалами. Влияние генотипа не было существенным при инициации соматического эмбриогенеза ели колючей, однако при переходе к пролиферации проявлялось значительно. Цитологический анализ первичного каллуса показал присутствие соматических зародышей во всех исследуемых генотипах. Состав питательных сред влиял на процесс каллусогенеза, индукцию и пролиферацию ЭСМ. Морфогенный ответ на среде  $\frac{1}{2}$  DCR был выше, однако эмбриогенность каллуса была выше на среде  $\frac{1}{2}$  LV.

**Благодарности.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 18-34-00434 мол\_а «Регуляция путей регенерации хвойных в системе *in vitro* на примере представителей рода *Picea*» (2018–2019 гг).

#### ЛИТЕРАТУРА

- Cram W. H.** Needle color and vigor of inbred progenies of *Picea pungens* // HortScience, 1984. – Vol. 19. – P. 125–126.
- Gupta P. K., Durzan D. J.** Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*) // Plant Cell Repts, 1985. – Vol. 4. – P. 177–179.
- Gupta P. K., Timmis R., Pullman G.** et al. Development of an embryogenic system for automated propagation of forest trees / Scale-up and automation in plant propagation (ed. by Vasil I. K.), vol. 8. – SanDiego, CA: Academic Press, 1991. – P. 75–93.
- Litvay J. D., Verma D. C., Jonson M. A.** Influence of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of wild carrot (*Daucus carota* L.) // Plant Cell Rep., 1985. – Vol. 4. – P. 325–328.
- Savella L.** Propagation of *Picea pungens glauca* cultivars // The International Plant Propagators' Society Proceedings, 1965. – Vol. 15. – P. 199–202.
- Tautorus T. E., Fowke L. C., Dunstan D.** 1. Somatic embryogenesis in conifers // Can. J. Bot., 1991. – Vol. 69. – P. 1873–1899.