

6. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.*, 1962. - V.15. - P.473-497.

Резюме

Изучали влияние возраста незрелых зародышей подсолнечника при их доращивании *in vitro* на частоту образования и некоторые признаки полученных из зародышей растений. Установлено, что зародыши всех возрастов формируют в условиях *in vitro* растения, однако возраст зародышей влияет на такие признаки как высота растений и длина вегетационного периода.

Вивчали вплив віку незрілих зародків соняшника при їхньому дорощуванні *in vitro* на частоту утворення й деякі ознаки отриманих із зародків рослин. Встановлено, що зародки кожного віку формують в умовах *in vitro* рослини, однак вік зародків впливає на такі ознаки як висота рослин і довжина вегетаційного періоду.

Influence of age of sunflower immature embryos after *in vitro* germination and growth on the frequency of adult plant production and some traits of the plants raised from the embryos was studied. It was found that embryos of any age can produce plants under *in vitro* conditions, however, the age of embryos was influencing such traits as plant height and vegetative period length.

ТРЕТЬЯКОВА И.Н., ИВАНИЦКАЯ А.С., БАРСУКОВА А.В., ИЖБОЛДИНА М.В., НОСКОВА Н.Е.

Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН

Россия, 660036, Красноярск, Академгородок, e-mail: culture@ksc.krasn//ru

БИОТЕХНОЛОГИИ ХВОЙНЫХ IN VITRO: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

На основании свойства тотипотентности клеток в биотехнологии микрклонального размножения хвойных появились два новых направления – соматический и микроспориальный эмбриогенез. Андроклиния *in vitro* – феномен перехода спорогенных клеток с гаметофитного пути развития, на спорофитный путь в культуре *in vitro*, представляет собой одно из перспективных направлений для получения гаплоидных и дигаплоидных растений-регенерантов в современных биотехнологических исследованиях. Это явление активно изучается у различных представителей покрытосеменных растений [Круглова, Горбунова, 1997, 2001; Круглова, Куксо, 2006] то время как у голосеменных растений подобные исследования редки и только начинаются [Иванова и др. 2006]. Соматический эмбриогенез - это асексуальный способ размножения, был открыт 20 лет назад у *Picea abies* [Hagman et al]. Полученные эмбриогенные клеточные линии сохраняют компетентность длительный период времени и позволяют получить генетически однородный селекционный материал улучшенных форм. Несмотря на активные исследования в области соматического эмбриогенеза у хвойных, регенерация растений данным способом все еще остается проблематичной для большинства видов. Критическим моментом является процесс созревания соматических зародышей, поскольку он влияет на жизнеспособность полученных *de novo* зародышей, и особенно на их способность прорасти и продуцировать нормальные растения-регенеранты.

Изучение соматического и микроспориального эмбриогенеза открывает большие перспективы в познании процесса клеточной дифференцировки и реализации морфогенетических программ в эмбриогенезе и раннем онтогенезе растительного

организма, а так же получении высокопродуктивных генетически однородных чистых линий. Применение эффективных инновационных технологий, таких как соматический эмбриогенез и андроклиния в сочетании с криоконсервацией и различными селекционными программами даст возможность для получения, раннего отбора и испытания ценных генотипов, их быстрого распространения.

Цель настоящих исследований заключалась в разработке биотехнологии получения соматических зародышей и андроклинных эмбриоидов у хвойных видов Сибири, проведении цитоэмбриологического анализа полученных структур и определении гормонального контроля морфогенных и андроклинных каллусов.

Материалы и методы

Объектом настоящих исследований являлись деревья лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.), произрастающие в естественных насаждениях на территории Республики Хакасия и Тыва, в искусственных насаждениях г. Красноярска. В работе использовали 32 генотипа лиственницы сибирской устойчивых и неустойчивых к поражению лиственничной почковой галлицей. Деревья сосны сибирской (кедра сибирского – *Pinus sibirica* Du Tour), произрастали в естественном древостое Западного Саяна (Ермаковский и Шушенский районы Красноярского края) и на клоновых прививочных плантациях Западно-Саянского Опытного лесного хозяйства. Для взятия образцов использовалось 13 деревьев-доноров из естественного древостоя и 20 клонов, опыленных пыльцой материнских деревьев из естественного древостоя и гетерозисного дерева с однолетним развитием женских шишек..

В качестве эксплантов использовались мегагаметофиты, незрелые зиготические зародыши, а также сегменты однолетних вегетативных побегов, микроспороциты у лиственницы сибирской и сосны сибирской

Для инициации эмбриональной массы из зиготических зародышей использовались базовые MS, ½ MS [Murashige ., Skoog 1962], ½ LV, MSG, DCR [Plant cell...1995] и K₉₉ [Deutch et.al.,2004] с добавлением мезоинозита, L-глутамина, фитогормонов: 2,4-Д и 6-БАП, сахарозы, а также агара или Gelrite. Для пролиферации эмбриональной массы концентрация 6-БАП, 2,4-Д и сахарозы снижалась в 2-4 раза (у разных видов по-разному). Эксперименты по индукции и пролиферации эмбриогенного каллуса проводились в темноте при температуре 24 ± 1°C. Для перехода соматических зародышей к созреванию экспланты культивировались на безгормональных базовых средах с активированным углем в течение 1 нед. Для созревания соматических зародышей в среды добавлялись мезоинозит, L-глутамин, 2,4-Д, АБК, сахароза, а также агар. Культивирование проводилось на свету, при 16-ти часовом фотопериоде и температуре 24 ± 1°C.

Для индукции каллуса из сегментов вегетативных побегов проводилась обработка эксплантов низкой температурой (+2-3°C в течении трех дней) на средах DCR [Malabadi, Van Staden 2005] и ½ MS, содержащих сахарозу, активированного угля и Gelrite без гормонов. Для индукции каллусообразования проводился перенос эксплантов на базовые среды с добавлением L-глутамина, гидролизата казеина, мезоинозита, сахарозы и Gelrite, а также 2,4-Д, 6-БАП и индолилуксусной кислоты (ИУК). Пролиферация каллусных культур проводилась на средах DCR и ½ MS, содержащих сахарозу, 2,4-Д и БАП, а также Gelrite (в темноте, при температуре 24±1°C).

Для индукции андроклинных культур у лиственницы сибирской экспланты вводились в культуру на протяжении зимы и ранней весны, и не подвергались дополнительной предобработке, в то время как индукция андроклинии в весенний период, когда температура воздуха поднималась выше нуля, требовала дополнительной стрессовой обработки эксплантов низкими положительными температурами (2-3°C) в течение 1-3 сут. Андроклинные культуры выращивались на твердых и жидких средах MS, ½ MS, WPM и K₉₉, различающиеся по составу макроэлементов, витаминов и

гормонов. В качестве желирующего компонента использовался агар, в концентрации 6 г/л.

Для проведения цитологического анализа использовались давленные препараты. Окраска эксплантов проводилась сафранином с добавлением капли метиленового синего. Просмотр микроскопических образцов осуществлялся на микроскопе МБИ-6. Статистическая обработка данных проводилась по стандартным методикам при помощи Microsoft Excel. Морфологические изменения фиксировались цифровой фотокамерой Fudjifilm FinePix S7000 (Япония).

Иммуноферментный анализ растительных образцов проводился в лаборатории физиологии растений Института биологии УНЦ РАН по методике, разработанной проф. Г.Р. Кудояровой с соавторами [Кудоярова и др., 1986; Кудоярова, 1990;]. Было определено содержание индолилуксусной кислоты (ИУК), абсцизовой кислоты (АБК) и цитокининов.

Результаты и обсуждение

Соматический эмбриогенез

Эксперименты по культивированию недоразвитых изолированных зародышей и вегетативных побегов у лиственницы сибирской и кедра сибирского на модифицированных средах MS, MSG, LV и DCR с различными концентрациями гормонов и в разном их соотношении друг с другом позволили манипулировать процессами морфогенеза клеток, образующими эмбриогенный каллус и соматические зародыши. Под действием гормонов 6-БАП и 2,4-Д соматические клетки зиготических зародышей на 5-10 сут. культивирования начинали интенсивно растягиваться (до 200-300 мкм в длину), и превращаться в эмбриональные трубки. Эмбриональные трубки подвергались неравному делению, в результате которого на одном из полюсов формировались эмбриональные клетки диаметром 39-47 мкм. В течение следующих 5-7 сут. клетки инициалей активно делились и образовывали эмбриональные глобулы, которые окружались эмбриональными трубками. Наблюдалось образование эмбрионально-суспензорной массы. (ЭСМ). Перенос эксплантов через 1 мес. на среды с пониженным содержанием цитокининов и сахарозы вызывал интенсивную пролиферацию ЭСМ, в которой шел активный кливаж. Через 1 мес. культивирования на этих средах возникали торпедообразные соматические зародыши. При субкультивировании ЭСМ на базовых средах, содержащих АБК, соматические зародыши приобретали биполярную структуру: на одном из полюсов формировались примордии семядолей, на другом – зародышевый корешок и хорошо развитый суспензор.

Формирование ЭСМ из сегментов вегетативных побегов у лиственницы сибирской начиналось на 8-12-е сут. культивирования, после переноса эксплантов с безгормональной среды, на которой они подвергались холодной обработке, на индукционную среду, содержащую 2,4-Д и 6-БАП. ЭСМ, полученная из сегментов вегетативных побегов, представляла собой отдельные клеточные скопления. Через 20 сут. культивирования в ЭСМ были обнаружены зародышеподобные структуры. Полученные эмбриониды обнаруживали строение, характерное для зиготических и соматических зародышей хвойных растений на стадии проэмбрио.

Определение эндогенных гормонов в эмбриогенном каллусе лиственницы сибирской и кедра сибирского показало, что в них происходило резкое возрастание уровня цитокининов (в 2 раза) по сравнению с исходными эксплантами. Содержание ИУК в морфогенном каллусе кедра осталось без изменения, но увеличивалось содержание АБК. В морфогенном каллусе лиственницы содержание ИУК снизилось до 9.5 нг/г и увеличилось содержание АБК. Вероятно, компетентность клеток к гормонам при образовании эмбриогенного каллуса у разных видов зависит от эндогенного содержания гормонов в эксплантах. Были выявлены генотипы донорских

растений лиственницы сибирской и сосны сибирской, способные давать чистые эмбриогенные линии и соматические зародыши.

Андроклинные культуры лиственницы сибирской

У взятых для микрорепродукции микростробилов лиственницы сибирской в мейотической стадии развития в течение всего осенне-зимнего и ранневесеннего периода происходило быстрое завершение мейоза в культуре *in vitro* (в течение нескольких дней) и наблюдалось переключение развития с гаметофитного на спорофитный путь.

При введении микростробилов в период микроспорогенеза (конец марта – начало апреля) на среду MS с 0,2-0,5 мг/л 2,4-Д, через 1-2 сут. культивирования наблюдался распад тетрад и происходило образование микроспор. В течение 7-10 сут. культивирования проходил митоз, и микроспоры делились на две равные клетки, т.е. становились на аномальный (спорофитный) путь развития. В течение 14-21 сут. формировался андроклинный каллус, в котором шли активные клеточные деления – происходило формирование эмбриоидов. При увеличении содержания 2,4-Д до 2-5 мг/л образование андроклинного каллуса у лиственницы не происходило. Наблюдалось формирование некротических очагов.

Иммуноферментный анализ микростробилов лиственницы сибирской, в которых проходит процесс микроспорогенеза, показал, что в них содержатся цитокинины, ауксины и абсцизовая кислота. Наибольшее количество в микростробилах лиственницы содержится цитокининов, количество которых было одинаковым как у деревьев пораженных лиственничной почковой галлицей, так и у здоровых деревьев (288 и 284 нг/г соответственно). Содержание ИУК в микростробилах значительно ниже (\approx в 10 раз). Однако содержание ауксинов в микростробилах пораженных галлицей деревьев оказалось выше, чем у непораженных. Особого внимания заслуживают данные по содержанию АБК, которые у пораженных и непораженных деревьев значительно различаются. Микростробиолы пораженных деревьев содержат в 2 раза больше этого гормона (92 нг/г против 49,7 нг/г).

Вероятно, для успешного роста андроклинного каллуса и вызревания эмбриоидов культуры лиственницы сибирской не нуждаются в увеличении концентрации АБК и дополнении цитокининов. Ауксины требуются для роста андроклинных каллусов в небольших количествах

Таким образом, у представителей сибирских видов хвойных путем подбора состава питательных сред на тканевом и клеточном уровне были получены морфогенные каллусы различного генетического и онтогенетического происхождения, способные продуцировать эмбрионально-суспензорную массу, из которой формировались соматические зародыши. Образование морфогенных и андроклинных каллусов требует гормональной регуляции.

Выявлены генотипы донорских растений лиственницы сибирской и сосны сибирской, способные давать чистые эмбриогенные линии и соматические зародыши.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 06-04-08040-офи_а, гранта РФФИ-ККФН «Енисей» № 04-040-96810

Литература

1. *Иванова А.Н., Третьякова И.Н., Вязовецкова А.С.* Индукция андрогенных культур у лиственницы сибирской // Онтогенез. – 2006. – Т. 37. № 1. – С. 32-42.
2. *Круглова Н. Н., Горбунова В. Ю.* Каллусогенез как путь морфогенеза в культуре пыльников злаков // Успехи современной биологии. – 1997. – Вып. 1. Т. 117. – С. 83-94.
3. *Круглова, . Горбунова Н.Н.* Стресс как фактор индукции андроклинии у злаков. Стресс-реакция *in situ* морфогенных спорогенных клеток пыльника // Успехи современной биологии. – 2001. – Т. 121. - №4. – С. 378-387.

4. *Круглова Н. Н., Куксо П.А.* Стрессовая индукция андроклинии // Успехи современной биологии. – 2006. – Т. 126. № 3. – С. 256-272.
5. *Кудоярова Г.Р.* Иммуноферментный анализ регуляторов роста: применение в физиологии растений и экологии / Уфа: БНЦ УрО АН СССР, 1990. 132 с.
6. *Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Еркеев М.И.* Иммуноферментное определение содержания индолилуксусной кислоты в семенах кукурузы с использованием меченых антител // Физиология растений, 1986. Т. 33. № 6. С. 1221-1227.
7. *Deutsch F., Kumlehn J., Zeigenhagen B., Fladung M.* Stable haploid poplar callus lines from immature pollen culture / Physiologia plantarum. – 2004. – V. 120. – P. 613-622.
8. *Hakman I., Fowke L.C., von Arnold S., Eriksson T.* The development of somatic embryogenesis in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). Plant Science. – 1985. – V. 38. – P. 53–59.
9. *Malabadi R. B., Van Staden J.* Somatic embryogenesis from vegetative shoot apices; of mature trees of *Pinus patula* // Tree Physiology. – 2005. – V. 25. – P. 11-16.
10. *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15. – №4. – P. 473-497.
11. Plant cell, tissue and organ culture: fundamental methods / Eds. O.L. Gamborg, G.C. Phillips. – Berlin: Springer-Verlag, 1995. – 358 p.

Резюме

Инициация соматического эмбриогенеза у хвойных видов – лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) и сосны сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) проводилась с использованием зиготических зародышей на разных стадиях их развития и сегментов вегетативных побегов, андроклинии из микроспор и недозрелых мужских гаметофитов. Культивирование велось на среде MS и ½ MS, ½ LV и MSG, DCR и K₉₉ с гормонами 2,4-Д, 6-БАП, ИМК и АБК в разных концентрациях. Образование морфогенного и андрогенного каллусов требует гормональной регуляции. Успешность соматического эмбриогенеза и андроклинии у хвойных видов связана с генотипом дерева и зависит от стадии развития эксплантов.

Induction of somatic embryogenesis in Siberian coniferous species - Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.) and Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) has been conducted from zygotic embryos on different stages and segments of vegetative shoots, androgenesis in vitro from microspores and immature male gametophytes. Culturing was made on MS, ½ MS, ½ LV, MSG, DCR and K₉₉ nutrition media with hormones 2,4-D, 6-BAP, IBA and ABK in different concentrations. The formation of morphogenic and androgenic callus depend on hormonal regulation. Success of somatic embryogenesis procedure of Siberian coniferous species connected with tree genotype and depends on stage of explants development.

ТРУХАНОВЕЦ Н. Л., МОЗГОВА Г. В.

Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси
220072 Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: N.Trukhanovets@igc.bas-net.by

УЛЬТРАСТРУКТУРА КЛЕТОК МЕЗОФИЛЛА ЛИСТА АЛЬБИНОСНЫХ И ЗЕЛЕННЫХ РАСТЕНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ В КУЛЬТУРЕ ПЫЛЬНИКОВ ПШЕНИЦЫ

В ходе естественного развития микроспоры растений проходят несколько этапов дифференцировки и превращаются в пыльцевые зерна. Однако при создании определенных условий в культуре клеток и тканей in vitro они могут развиваться по пути формирования гаплоидных зародышей. Такой андрогенетический путь развития называется также пыльцевым эмбриогенезом. Индукция пыльцевого эмбриогенеза